

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Parasitologia e Imunologia Aplicadas

RESPOSTA CELULAR À INFECÇÃO POR *Campylobacter. jejuni*  
EM EMBRIÕES E EXPLANTS DE ÍLEO DE AVES E  
PARTICIPAÇÃO DO CITOESQUELETO E LISOSSOMOS NO  
PROCESSO DE INVASÃO EM CÉLULAS CACO-2

Belchiolina Beatriz Fonseca

Uberlândia

Setembro – 2011

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Parasitologia e Imunologia Aplicadas

## RESPOSTA CELULAR À INFECÇÃO POR *Campylobacter. jejuni* EM EMBRIÕES E EXPLANTS DE ÍLEO DE AVES E PARTICIPAÇÃO DO CITOESQUELETO E LISOSSOMOS NO PROCESSO DE INVASÃO EM CÉLULAS CACO-2

Tese apresentada ao programa de Pós  
Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor.

Doutoranda: Belchiolina Beatriz Fonseca

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti

Co-Orientador: Dra. Daise Aparecida Rossi

Uberlândia

Setembro – 2011

### **E de Agora em Diante (Oswaldo Montenegro)**

E de agora em diante teria sido decretado o amor sem problemas  
E seriam vítimas os olhos, e as almas vagariam sem medo  
E de agora em diante seria pra sempre o que pra sempre acabara  
E seria tão puro o desejo dos homens, que Dionísio enlaçaria a virgem com braços enternecidos  
E aplaudiríamos, calmos e frenéticos como um são Francisco febril  
E de agora em diante pra trás não haveria  
Não mais a virtude dos fortes, mas o mérito dos suaves  
O homem feminino e a mulher guerreira  
O amor comunitário, sem ciúmes.  
Dariam as mãos as moças que amo e brincariam de roda em volta de minha preferida  
E um artesão criança esculpiria flores nos cabelos e um sorriso sincero no rosto  
E de agora em diante Ghandi tava vivo pra sempre  
E Jesus era hippie, Beethoven era roqueiro e Lenon era como nós  
E se não desse certo, de agora em diante, ao menos teríamos tentando.

## **Dedicatória**

Dedico essa obra ao João Lucas que completou minha vida de uma forma tão serenamente confusa. Eu me tornei melhor depois de você. Aos meus pais, ainda responsáveis pelo que continuo sendo. Ao querido Fulvio, meu porto seguro, o grande amor da minha vida. A Mamy, querida Dra. Daise Rossi pela amizade e por acreditar em mim.

## **Agradecimentos**

Agradeço a força inspiradora, Deus, que me permite usar meus recursos para realizar meus sonhos.

Ao professor Dr. Marcelo Emilio Beletti pela paciência, sabedoria e ensinamentos que vão além dessa obra. Obrigada por ter aceitado me ajudar. Desculpe-me pelas falhas, pelo tempo e reagentes perdidos. E saiba que tenho muito orgulho de ter trabalhado com você pela sua sabedoria e pela grande bondade e humildade. Na minha teoria, os “melhores e maiores” não se dão conta de o quanto são bons e sabem ajudar de uma forma serena, pois ensinar é algo mágico e só corações nobres como o seu entendem isso.

A Dra. Daise Rossi por tanto me ajudar intelectualmente e afetivamente. Muito do que sou hoje é consequência de todo seu apoio. Obrigada pelo convívio e pelo carinho.

Ao Dr. Carlos Ueira Vieira por ter aberto as portas do Laboratório de nanobiotecnologia.

Ao Dr. Cláudio, um ser humano tão simples, tão simpático e que tanto me ensinou durante o curso.

Ao Dr. Heriberto que nunca deixou de me responder um email quando algo ocorria de errado com minha bactéria. Aprendi a conviver melhor com a Campylobacter depois do senhor.

Ao Dr. Paulo Lourenço da Silva que me ensinou a amar a avicultura e pelo carinho e apoio.

Aos professores da Medicina veterinária que sempre me apoiaram de alguma forma. Dr. Fernando Ferreira (continua sendo meu ídolo), Dr. Chico, Dr. Laerte, Dra. Dagmar, Dr. Paulo Roberto, Dra. Eneida, Dr. Cesar, Dr. Adriano Pirtousheg, Dr. Evandro, Dr. Mathias, Dra. Sueli Cristina, Dr. João Batista.

Aos professores do Instituto de ciências biomédicas pelo grande apoio, Dra. Eloisa, Dra. Neide, Dra Daise Oliveira, Dra. Marcia Berbet.

Ao Dr. Lino, querido, ser humano incrível, que sempre esteve pronto a ajudar em nossos trabalhos.

É impossível realizar um trabalho sozinho e cada um contribui de uma forma valiosa. Corre um gel, desliga um equipamento, reativa uma cepa, troca meio de uma célula (...). O resultado

desse trabalho contou com a ajuda de muitos. Alguns foram cruciais na conclusão desse trabalho.

Dentre as ajudas indispensáveis, quero agradecer ao Ms. Marcelo Arantes Levenhagem, um ser humano com tantas virtudes que me ensinou muito sobre a vida e nunca mediu esforços para me ajudar. Obrigada por tudo.

A Roberta Torres de Melo, amiga, inteligente, competente e linda. Se não fosse você com sua dedicação e interesse minhas cepas teriam morrido várias vezes.

A Thaise que me ensinou tudo sobre PCR em tempo real, me ajudou na padronização. Durante todo esse tempo aprendi a gostar muito de você.

A Letícia, grande amiga, que me ajudou na coleta dos materiais e em várias reações. Obrigada por tudo, de coração.

A Carol, Ligia, Isabela e Priscila que tanto me ajudaram e mais que alunas, hoje fazem parte da minha vida afetiva, meio irmãs, meio filhas, meio alunas, meio amigas.

Obrigada minha querida amiga Eliane pela doçura, grande apoio e perfeccionismo que melhora a qualidade das nossas produções.

Aos amigos do Laboratório de Histologia e Centro de Microscopia avançada. Àqueles que me ajudaram e me salvaram nos momentos de apuro. À Rosiane que parou tudo por minha causa, ao Fabrício que ensinou a Isabela a trabalhar com a microscopia de Luz e me ajudou com as lâminas na hora do aperto. À querida Susana, uma pessoa que tenho muito carinho. “Às meninas da Neide e da Eloisa” pelo convívio diário e pelas “gracinhas” que vocês são. Angélica, Belisa, Mariana, Andressinha, Ester, Priscila, Letícia, Idessania, Lorraine. À Juliana, Moline e a Priscila (essa última me salvou algumas vezes), meu muito obrigada pela convivência diária. Aos técnicos e amigos Juju (Jucelia) obrigada pelo café e pela mãezona que você é da gente. À Mariane, obrigada pelo apoio com o confocal, A Eliete pela convivência e ao Rui que me ensinou a fazer lâminas, mas ainda não foi jogar sinuca lá em casa.

A todos do laboratório de Biotecnologia Animal, amigos queridos da convivência diária, dos risos, das festinhas. Ao Gui que também sempre me ajudou com sua energia boa. A Francesca, Dudu, Raquel, Mariela, Monica, Adelia, Bia, Liliane, Isaurinha, Andrea Leão, Cecília, dona Ilda e a todos do laboratório, obrigada pelo convívio diário.

Àqueles que conheci no Laboratório de nanobiotecnologia e que muitas vezes compartilhamos nossas angústias. À Patricia, Woshington, Fabiana, Vanessa, Luciana, Iara, Galber, Tamiris, Paula, Robson...

Àqueles da vida pessoal, meu porto seguro, que mesmo distantes dos laboratórios entendem minhas angústias e sucessos. Aos meus sobrinhos, Lucas, Amanda, Lilica e ao João Gabriel pela juventude que alegra minha alma. Às minhas irmãs, Isanete e Cidinha que sempre me apoiaram em meus projetos, Aos meus irmãos, Giovani e Ivair pela presença constante e apoio. À Jovania por sustentar outros projetos durante minha ausência, a Sidinesia pelo carinho de sempre e ao Gilmar que apareceu nas nossas vidas e muito veio nos ensinar com sua bondade.

Ao meu marido, Fúlvio, por toda demonstração de amor, por ser meu porto seguro nas horas que tanto precisei. Obrigada também pelas idéias e o inglês e ao meu filho João Lucas e aos meus pais, Luzia e Baltazar.

Aos meus sogros, Anita Godoy tão especial e ao Godoy, aos meus cunhados Felipe, Fernanda e Marcela pelo carinho.

Aos amigos da vida pessoal que estão ao meu lado para completar minha vida Max Siqueira, Adriana Garcia, Kárita Luiza, tia Branca, Bernardo, Neidinha, Michele, Stelinha, Camilo, Fernanda Gatinha, Helio, Hernane, Luciano.

Aos órgãos de fomento (FAPEMIG, CNPq, CAPES) pela ajuda financeira e por acreditar nos nossos projetos.

Às empresas BIOVET, Brazil Foods e Granja Planalto por fornecerem ovos e aves.

Às aves sacrificadas durante esse experimento.

## **Lista de abreviações**

CCDA - Agar base blood free

cDNA – DNA complementar

DEMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

DEPC - Diethylpyrocarbonate

DV – Desvio padrão

ECUP - *Escherichia coli* uropatogenica

GI - Gastrointestinal

IAL – Instituto Adolfo Lutz

LOS - Lipooligossacarídeo

MET - Microscópio eletrônico de Transmissão

MOMP - proteína de membrana externa

PAIs – Ilhas de patogenicidade

SGB - Síndrome de Guillain Barré

SPF – Specific pathogen free

TLR - Toll-like receptor

UFC – Unidades formadoras de colônia

VNC – Viável não cultivável

## SUMÁRIO

<b>Introdução Geral</b>	1
<b>Revisão da Literatura</b>	2
<b>Capítulo I:</b> Caracterização da cepa de <i>Campylobacter jejuni</i> IAL 2383 isolada de humanos quanto a virulência, termotolerância e resistência a antimicrobianos	19
Resumo	20
Abstract	21
1. Introdução	22
2. Objetivos	23
3. Material e Métodos	23
4. Resultados	27
5. Discussão	28
6. Conclusão	29
<b>Capítulo II:</b> Transferência, viabilidade e colonização de <i>Campylobacter jejuni</i> em vitelos e embriões de aves	30
Resumo	31
Abstract	32
1. Introdução	33
2. Objetivos	33
3. Material e Método	33
4. Resultados	39
5. Discussão	43
6. Conclusão	45

<b>Capítulo III:</b> Quantificação de transcritos de citocinas e quimiocinas e alterações morfométricas e estruturais após invasão de <i>Campylobacter jejuni</i> em <i>explants</i> de íleo de aves SPF	46
Resumo	47
Abstract	48
1. Introdução	49
2. Objetivos	49
3. Material e Métodos	50
4. Resultados	56
5. Discussão	62
6. Conclusão	66
<b>Capítulo IV:</b> Participação do citoesqueleto e compartimentos lisossomais nos mecanismos de invasão de <i>C. jejuni</i> em células Caco-2 e resposta celular pela análise morfométrica e quantificação de transcritos de citocinas e quimiocinas	68
Resumo	69
Abstract	70
1. Introdução	71
2. Objetivos	71
3 Material e Métodos	72
4. Resultados	80
5. Discussão	89
6. Conclusão	92
<b>Considerações Finais</b>	93
Referências bibliográficas	96

## RESUMO

A interação patógeno-hospedeiro de *C. jejuni* é um assunto ainda pouco explorado em aves e humanos. Assim esse trabalho objetivou avaliar a habilidade de *C. jejuni* penetrar e colonizar ovos de aves e os efeitos da cepa virulenta de *C. jejuni* IAL 2383 em embriões de aves SPF; também foram avaliadas a quantificação de transcritos de citocinas e alterações morfométricas em *explants* de íleo de aves SPF infectados, a participação do citoesqueleto e dos lisossomos nos processos de invasão e internalização de *C. jejuni* em células Caco-2 e a resposta celular pela quantificação de transcritos de citocinas inflamatórias. O experimento com ovos e embriões indicou que *C. jejuni* é capaz de passar pelos poros dos ovos, colonizar o vitelo e levar a alta mortalidade embrionária precoce aumentando as dimensões dos enterócitos de embriões. Em *explants* de aves, a bactéria é capaz de invadir, aumentar o tamanho dos enterócitos e induzir a expressão de transcritos de TGF- $\beta$ 3 precocemente e IL-1 $\beta$  com 4 horas de infecção. O processo de invasão em Caco-2 é dependente dos microfilamentos de actina e tubulina e ao se internalizar a bactéria se funde com lisossomos. A resposta celular a essa invasão é a distensão celular e a expressão de transcritos de IL-8 que é uma citocina pró inflamatória. Esses resultados indicam que *C. jejuni* não é apenas um microorganismo comensal em aves. Além disso, a invasão desse microorganismo em células Caco-2 é dependente de actina e tubulina e a internalização leva a fusão com lisossomos, o que provoca a degradação bacteriana induzindo a produção de citocinas inflamatórias e distensão celular.

Palavras chaves: Caco-2, IL-8, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 3, distensão, *explant*, aves.

## ABSTRACT

The host-pathogen interactions of *C. jejuni* is a little explored subject in birds and humans. Thus, this study aimed to evaluate the passage and the effects of virulent strain of *C. jejuni* IAL 2383 in SPF embryos of birds, the expression of cytokines and morphological changes in SPF birds explants ileum infected with *C. jejuni* and verify the cytoskeleton and lysosomes participation in the processes of invasion and internalization of *C. jejuni* in Caco-2 cells and the cellular response by quantifying the expression of inflammatory cytokines. The experiment with eggs and embryos indicated that *C. jejuni* passes through the pores of the eggs, colonizes the vitellus and lead to high early embryonic mortality and increase the embryos enterocytes dimensions. In avian explants, the bacteria invades, increases the size of enterocytes and induces the expression of TGF- $\beta$ 3 and early IL-1 $\beta$  with 4hours of infection. The invasion process in Caco-2 cells is dependent on actin microfilaments and tubulin and to internalize the bacteria fused with lysosomes. The cellular response is the distention and cell expression of IL-8, a potent pro-inflammatory cytokine. These results indicate that *C. jejuni* is not just a commensal in birds. In addition, this microorganism invasion in Caco-2 cells is dependent on actin and tubulin and internalization leads to fusion with lysosomes, which causes bacterial degradation by inducing the production of inflammatory cytokines and cell strain.

Keywords: Caco-2, IL-8, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 3, distension, explants, birds.

## 1. INTRODUÇÃO

*Campylobacter jejuni* é a principal causa de toxinfecção bacteriana de origem alimentar (EFSA, 2009). A prevalência desta bactéria é mais significativa nas aves, sendo a carne de frango responsabilizada como o principal fator de risco aos consumidores (HUMPHREY et al., 2007).

Em aves a bactéria parece ter uma relação comensal enquanto em seres humanos pode levar a diarréia com agravamento por algumas síndromes auto-imunes após a infecção em algumas pessoas. A diferença entre a apresentação dos sintomas em aves e humanos ainda é pouco entendida (KETLEY, 1997; JACOBS-REITSMA, 2000; YU et al., 2006).

Apesar de nos últimos anos alguns trabalhos terem elucidado melhor a patogenia da bactéria em aves, ainda faltam dados consistentes para o melhor entendimento dessa patogenia. E apesar de ser considerado um comensal, há relatos de que a bactéria pode causar prejuízos aos lotes de frango sem sintomas clínicos aparentes (SARAKBI, 2002). Tais estudos, porém ainda são escassos muitas vezes, limitados a modelos celulares existindo ainda poucos estudos em enterócitos de frango.

A interação bactéria-célula hospedeira é outro tema ainda mal entendida e muito divergente, o entendimento da rota e mecanismo de invasão e evasão contribui para geração de métodos preventivos e de controle efetivos. Como essa interação parece ser cepa dependente, modelos experimentais bacterianos devem ser bem caracterizados para a melhor análise dos resultados.

A importância da *C. jejuni* para saúde pública, o grande consumo e consequente produção mundial da carne de frango aliados aos poucos estudos realizados sobre a patogenia da doença nas aves e o entendimento da interação da bactéria com as células epiteliais, instigam estudos que serão importantes para o controle dessa bactéria.

## 2.0. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Biologia de *Campylobacter jejuni*

O gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae*. As principais espécies implicadas em doenças gastrointestinais no homem são: *C. jejuni*, *C. coli* e *C. Iari*. São bastonetes Gram-negativos, curvos, delgados que medem 0,2µm a 0,8µm por 0,5µm a 5 µm. Quando duas ou mais células bacterianas estão agrupadas, elas formam um S ou um formato de asa de gaivota (VANDAMME et al., 1992). Essas bactérias são termófilas com crescimento ideal entre 37 a 42°C e microaerófilas. Demonstram características de motilidade devido à presença de flagelo, parede celular e cápsula de Gram negativos típicos (VANDAMME et al., 1992).

*Campylobacter jejuni* tem um genoma de aproximadamente 1600±1700 kilobases (kb) (NUIJTEN et al., 1990), com 1.654 pares de base (PB) com um nível de G(guanina) C (citosina) de aproximadamente 30,6% (FOUTS et al., 2005), que é relativamente pequeno quando comparado a outros enteropatógenos (NUIJTEN et al., 1990). Várias cepas contêm plasmídeos e em algumas os bacteriófagos foram descritas (TAYLOR 1992).

De acordo com Rollins e Colwll (1986), *Campylobacter* pode passar da forma de bacilo em espiral para cocoide quando exposta a atmosfera com alto nível de oxigênio ou outros elementos estressantes. Essa forma é denominada forma viável não cultivável (VNC) e representa uma maneira da bactéria sobreviver sob condições de crescimento que normalmente a bactéria não suporta.

### 2.2. Patogenicidade bacteriana

A capacidade de um microorganismo causar doença é denominada patogenicidade. A diferença entre microorganismos patogênicos e não patogênicos é que os primeiros expressam genes que codificam fatores de virulência responsáveis por colonizar e desencadear eventos que alteram a fisiologia hospedeira aparecendo assim, a doença (BONITA et al., 2010).

Adesinas, toxinas, invasinas, sistemas de captação de ferro, e os fatores que rompem as defesas do hospedeiro são importantes fatores de virulência. Além disso, eventos que levam a modificações de seqüências genéticas podem levar à aquisição de novos fenótipos

pelas bactérias o que torna alguns microorganismos ainda mais patogênicos perpetuando essa característica para sua progênie (TORTORA et al., 2002).

Os genomas bacterianos são formados por uma seqüência principal com conteúdo de G+C uniforme e freqüência homogênea de uso de códons. Esta região possui genes cujos produtos estão envolvidos em funções essenciais para o microrganismo (HACKER e KAPER, 2000). Existem também, regiões que diferem do restante do genoma tanto no conteúdo G+C quanto na freqüência de uso de códons, fato que sugere uma transferência gênica horizontal. Essas regiões que codificam funções acessórias fornecem vantagens ao microrganismo, como resistência a antibióticos e propriedades envolvendo simbiose ou patogenicidade (HACKER e KAPER, 2000). Tais regiões são denominadas de ilhas gênicas e são classificadas de acordo com as funções dos genes que possuem em Ilhas de Simbiose, Ilhas Metabólicas, Ilhas de Resistência ou Ilhas de Patogenicidade (PAIs) (GAL-MOR e FINLAY, 2006).

As PAIs possuem genes de virulência e ocupam regiões entre 10 a 100 Kb do DNA. Algumas estirpes possuem pequenos segmentos (1-10 Kb) de DNA na vizinhança da PAI chamadas de “ilhotas de patogenicidade” (GAL-MOR e FINLAY, 2006).

Hacker et al. (1990) foi quem introduziu o conceito de PAIs ao estudar a virulência de amostras de *Escherichia coli* uropatogenica (ECUP). Durante seus estudos, os autores observaram uma ligação entre os genes que codificavam fatores de colonização que permitem às ECUPs aderirem às células de vias urinárias e o gene responsável pela produção de hemolisina (fator de virulência das ECUPs). Esses genes estavam presentes em grandes regiões cromossômicas, que apresentavam características próprias e grande instabilidade.

Tanto microorganismos gram-negativos como gram positivos podem conter as ilhas de patogenicidade e atuarem em células animais ou vegetais. *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Citrobacter rodentium*, *Legionella pneumophila*, *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *Vibrio cholerae*, *Erwinia amylovora*, *Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Listeria* spp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Clostridium difficile* são exemplos de microorganismos em que as ilhas foram descritas (GAL-MOR e FINLAY, 2006)

Os principais fatores de virulência encontrados nas ilhas de patogenicidade são fatores de aderência, toxinas, sistema de captação de ferro, invasão, modulinas, efetores, sistema de secreção do tipo III e sistema de secreção tipo IV (HACKER e KAPER, 2000).

Existem nas PAIs a presença de fagos temperados, sequências de inserção e integrases presença de “hot spots” (pontos quentes), e significando um local no genoma onde a inserção ou deleção é facilitada. Isso pode indicar que a transferência horizontal de fragmentos de

DNA seja, provavelmente, a explicação para a aquisição de novos fatores de virulência pelas bactérias (JUHAS et al., 2009).

As ilhas de patogenicidade codificam as proteínas dos sistemas de secreção. Esses sistemas são dispositivos moleculares que possibilitam a translocação de proteínas efetoras das bactérias para o interior das células hospedeiras. Essas proteínas efetoras podem tanto inibir quanto ativar a resposta de defesa do hospedeiro. O sistema de secreção tipo III (T3SS) é geralmente encontrado em bactérias que infectam o trato gastrointestinal. Nesse sistema, as proteínas efetoras entram na célula hospedeira por um modelo denominado “seringa molecular”. No interior da célula, as proteínas efetoras interagem com domínios de proteínas hospedeiras, por meio da fosforilação ou transferência de resíduos, que, normalmente, resulta em uma cascata de reações que promovem modificações no citoesqueleto, escape de sistema de defesa no interior de fagossomos, morte e outras alterações celulares (MOTA et al., 2005).

### **2.3. Trafego de patógenos no epitélio intestinal**

As três rotas de invasão que os microorganismos utilizam no trato intestinal são via células M, células epiteliais e células dendríticas (VASQUEZ-TORREZ e FANG, 2000). Uma variedade de espécies de vírus, bactérias e protozoários translocam o epitélio intestinal via células M (OWEN, 1999; SANSONETTI e PHALIPON, 1999) e assim, a invasão pelo epitélio torna-se o evento secundário na cronologia da invasão da mucosa. Exemplos de microorganismos com tropismo por células M são *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica* e *Shigella* spp na translocação através dos folículos associados ao epitélio (CLARK e JEPSON, 1994; JONES et al. 1994). Essas bactérias translocam através das células M e são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas residentes.

Há muitos anos atrás, Takeuchi (1966) mostrou evidências por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) a invasão direta de *Salmonella* pelos vilos das células epiteliais *in vivo*. Parece claro que as células do epitélio intestinal respondem a patógenos invasivos expressando citocinas pro inflamatórias e quimiocinas (JUNG et al., 2005) que promovem a atração e após a migração transepitelial de leucócitos polimorfonucleares, interrompendo assim, a permeabilidade do epitélio (McCORMICK et al., 1995).

Bactérias mutantes de *S. typhimurium* (EVEREST et al., 1999) e mutantes de *Y. enterocolitica* (PEPE et al., 1993) incapazes de invadir células M ou epitélio intestinal ou entrada via placas de Peyer's ainda conservam a capacidade de disseminação extraintestinal e

provocar doenças sistêmicas. Isso sugere que rotas alternativas a células M e aos vilos das células epiteliais podem existir para atravessar a barreira epitelial.

A captação bacteriana parece ser mediada por células dendríticas pela abertura das zônulas de oclusão “tight junctions” e pelo envio dendritos para o lúmen do epitélio. Estas células dendríticas expressam proteínas que podem estar envolvidas na abertura do epitélio preservando, contudo a impermeabilidade da barreira epitelial enquanto se move via transcelular (RESCIGNO et al., 2001).

O processo de “zipper” proposta por Isberg (2001) corresponde ao forte envolvimento do corpo bacteriano com a célula hospedeira que é determinada pela alta afinidade de ligação da proteína bacteriana com o receptor molecular da superfície da célula hospedeira envolvida com a adesão celular. Diferentes moléculas estão envolvidas nessa ligação para adesão celular como, por exemplo, integrinas da família  $\beta 1$  ou a ligação da internalina A com a E-caderina (MENGAUD et al., 1996). Isberg (2001) ainda cita a importância de proteínas envolvidas com o sistema de invasão das bactérias patogênicas.

#### **2.4. Fatores de Virulência e patogenicidade da *Campylobacter jejuni***

Depois de ingerida pelo ser humano, *C. jejuni* sobrevive ao ambiente hostil do estômago e do intestino delgado e ao chegar ao intestino grosso, a bactéria coloniza a mucosa e adere à superfície das células intestinais. O microrganismo produz uma “cytotoxicity distending toxin” (CDT) e possivelmente outras toxinas sem um papel claro na patogênese (PICKETT, 2000). Após, *C. jejuni*, invade e prolifera dentro da célula hospedeira e essa proliferação e invasão são consideradas a causa do dano celular pela indução da resposta inflamatória que resulta em diarréia com leucócitos nas fezes de humanos (HU e KOPECKO, 2000).

De acordo com Hu e Kopecko (2000), dentre os fatores de virulência conhecidos com a patogenia da *Campylobacter* pode-se destacar o flagelo, o lipooligossacarídeo, CDT e outras proteínas de membrana. Segundo Parkhill et al. (2000) *C. jejuni* apresenta seqüências hipervariáveis e a maioria dessas seqüências codifica proteínas envolvidas com a biossíntese ou modificação das estruturas de superfície como a capsula, lipooligossacarídeo e flagelo.

*C. jejuni* pode adquirir o DNA do ambiente e isso pode levar a recombinação entre cepas permitindo a geração de diversidade genética. Essa transferência de DNA plasmidal e

do cromossomo ocorre tanto *in vitro* como durante a colonização em aves, o que indica que a transformação natural tem um importante papel na plasticidade genômica e na disseminação de novos fatores tais como a resistência aos antibióticos (DE BOER et al., 2001; WILSON, 2003).

Dos componentes bacterianos envolvidos com a evasão imune os lipoolissacarídeos (LOS) da *C. jejuni* são altamente variáveis. Os LOS estão envolvidos com a aderência a célula hospedeira e servem como uma endotoxina que induz a resposta inflamatória intestinal (HU e KOPECKO, 2000). Várias estruturas de LOS de *C. jejuni* assemelham ao gangliosídeo neuronal do homem e esse mimetismo molecular é provavelmente responsável pelas doenças auto-imunes após infecção por *C. jejuni* como GBS e Mileler-Fisher (YU et al., 2006).

Karlyshev et al. (2005) cita que a uma grande variação entre as estruturas da capsula entre as diferentes *C. jejuni*. Para Bacon et al. (2001) e Jones et al. (2004) a capsula é importante para aderência e invasão em células epiteliais, colonização em aves e virulência. Além do papel de colonização do hospedeiro, a capsula pode desempenhar a proteção contra a dessecação ou infecção por fago.

#### **2.4.1. Motilidade e quimiotaxia da *Campylobacter jejuni***

A colonização requer a habilidade de se movimentar na camada da mucosa que cobre as células intestinais. Essa motilidade é conferida pelo flagelo polar e o movimento típico de “saca-rolha” (SZYMANSKI et al. 1995). O flagelo da *C. jejuni* e a motilidade flagelar é vital para a biologia da bactéria como colonização, virulência, secreção e invasão na célula hospedeira (WOSTEN et al., 2004).

O flagelo é formado por um corpo basal, gancho e filamento. Em *C. jejuni* o filamento flagelar é composto por duas proteínas *FlaA* e *FlaB* (HENDRIXSON et al., 2001) codificados pelos genes Fla A e Fla B (NUIJTEN et al. 1990b)

Para Takata et al. (1992) a quimiotaxia é a habilidade de um agente detectar e se mover em um gradiente químico. A quimiotaxia provavelmente tem um importante papel na ação comensal e também patogênica. Marchant et al. (2002) analisando a seqüência do genoma mostra que *C. jejuni* codifica sistemas de quimiotaxia similares ao da *E. coli*.

Hazeleger et al. (1998) examinaram o comportamento quimiotático de *C. jejuni* e perceberam que a bactéria exibiu uma resposta quimiotática positiva ao carbohydrate L-fucose, aminoácidos L-aspartato, L-cisteina, L-glutamato e L-serina, e os ácidos orgânicos piruvato, succinato, fumarato, citrato, malato e a-ketoglutarato e também mucina, uma

glicoproteína de alto peso molecular que contém L-fucose como açúcar terminal. De acordo com Hugdahl et al. (1988) os ácidos biliares parecem ser repelentes de *C. jejuni* e esta, apresenta motilidade quimiotática para aminoácidos que são encontrados em alto nível no muco do trato gastrointestinal de aves.

Vários relatos sugerem que a quimiotaxia é importante para determinação da virulência de *C. jejuni*, pois mutantes não quimiotáticos são incapazes de colonizar o intestino de modelos animais incluindo as aves (TAKATA et al. 1992; HENDRIXSON e DiRITA, 2004).

#### **2.4.2. Adesão e invasão de *Campylobacter jejuni***

Além do flagelo (GRANT et al., 1993), outras estruturas são importantes para adesão de *C. jejuni* em células epiteliais.(FOUTS et al., 2005; PARKHILL et al., 2000). Apesar de uma estrutura real tipo *pili* ainda não ter sido identificada em *C. jejuni*, proteínas do sistema de secreção tipo II que em outras bactérias como *Vibrio cholerae* e *Neisseria gonorrhoeae* estão associadas a montagem dos *pilis* foram identificadas em *C. jejuni* (WIESNER et al., 2003).

Monteville et al. (2002) verificou a importância da proteína CadF no processo de adesão. Essa proteína se liga especificamente a fibronectina, que está localizada basolateralmente em células epiteliais. Essa estratégia de ligação a fibronectina é usada por muitas bactérias patogênicas (JOH et al., 1999). Segundo Monteville (2003), CadF é importante para máxima ligação e invasão por *C. jejuni* “*in vitro*” e mutantes de CadF reduzem muito a colonização de *C. jejuni* em aves quando comparado a cepas selvagens. O mecanismo de invasão mediado por CadF ainda não está completamente definido (MONTEVILLE et al., 2003; MONTEVILLE e KONKEL, 2002). Zinprin et al. (2001) cita que esta proteína é importante para colonização em aves. Além da CadF, a ligação a fibronectina foi proposta também para flagelina e as proteínas de membrana externa MOMP (proteína de membrana externa) e LPS (lipopolissacarídeo) (MOSER et al., 1997).

O co-cultivo de *C. jejuni* e células INT-407 leva a produção e a secreção de ao menos 8 proteínas, incluindo CiaB. A mutante de *C. jejuni* CiaB adere igualmente ao tipo selvagem porém, não internaliza. Há especulação que a CiaB seja um membro do Sistema de secreção tipo III (KONKEL et al., 1999), mas isso não parece ser verdadeiro pois dados de seqüenciamento genômico de várias estirpes revelaram que *Campylobacter* não possui homólogos aos clássicos encontrados em bactérias entéricas, como enterotoxinas, adesinas,

invasinas e sistemas de secreção de proteínas do tipo III (KONKEL et al., 2008). Utilizando western blots, a secreção da proteína Cia foi reconhecida no soro de aves colonizadas com *C. jejuni* o que sugere que a proteína é produzida *in vivo* (BISWAS et al., 2007).

Outras proteínas de membrana importantes como adesinas são as lipoproteínas JlpA e Cap A (JIN et al., 2003; ASHGAR et al., 2007) . JlpA é crucial para ligação em algumas células e essa ligação ativa NF-κB e a proteína ativada por mitógeno p38 quinase (MAP) e ambas, contribuem com a resposta pro inflamatória (JIN et al., 2003).

Proteínas autotransportadoras representam uma ampla e crescente família de proteínas associadas a virulência presentes em bactérias gram negativas (HENDERSON et al., 2004). Cap A e Cap B são proteínas autotransportadoras que foram recentemente descritas em *C. jejuni*. Cao A é uma adesina autotransportadora e a sua deficiência leva a diminuição da aderência e invasão em células Caco-2 e a perda da habilidade em colonizar aves (ASHGAR et al., 2007).

Além das proteínas de membrana externa, há proteínas periplasmáticas que atuam como adesinas. Como exemplo, pode-se citar a PEB1 que se liga ao aspartato e ao glutamato e a Cj1496c que tem homologia ao transportador de magnésio. Entretanto, o mecanismo de ação dessas proteínas ainda não está bem estabelecido (KAKUDA et al., 2006; LEON-KEMPIIS et al., 2006). PEB 1 foi inicialmente identificada como a principal proteína antigênica da *C. jejuni* (PEI et al., 1991) com habilidade em se ligar a membranas de células HeLa (KERVELLA et al., 1993). Pei e Blaser (1993) cita que a PEB1 pertence a família de aminoácidos transportadores das bactérias Gram-negativas.

JlpA é uma lipoproteína frouxamente ligada a superfície da célula bacteriana que pode ser encontrada em cepas de *C. jejuni* e *C. coli* e é altamente conservada (JIN et al., 2001).

Além das estruturas bacterianas, Wooldridge et al. (1997) cita que processos na célula hospedeira também é importante para a internalização da bactéria, tal como a fosforilação de proteínas como a proteína quinase. Também, as caveolas parecem estar envolvidas no processo de invasão provavelmente, pela via endocítica.

As estratégias de invasão pela *C. jejuni* em células eucarióticas são controvérsias. Alguns autores relatam que a internalização de *C. jejuni* é exclusivamente actina-dependente (de MELO et al., 1989; KONKEL e JOENS, 1989; MONTEVILLE et al., 2003). Para Biswas et al. (2003) o processo é tanto actina como microtubulo dependente. Mas Russell e Blake (1994) citam que nem actina nem tubulina participam do processo. Contudo a invasão microtúbulo dependente tem ganhado importância (OELSCHLAEGER et al., 1993; HU e KOPECKO, 1999).

Parece que a forma de internalização depende do tipo celular. Bras e Ketley (1999), Grant et al. (1993) e Konkel et al. (1992) citam que em células Caco-2, *C. jejuni* transloca pelas monocamadas celulares pela rota transcelular. Mas em células T84 Monteville e Konkel (2002) citam que *C. jejuni* parece entrar basolateralmente. Chen et al. (2006) e MacCallum *et al.* (2005b) relatam que *C. jejuni* rompem as zônulas de oclusão das células polarizadas, sugerindo a translocação bacteriana pela rota paracelular.

As membranas das células epiteliais parecem estender pseudopodos para o envolvimento da *C. jejuni* e estes pseudópodes parecem conter microtúbulos. Uma vez internalizada, os vacúolos contendo *C. jejuni* parecem se mover ao longo dos microtúbulos para a região perinuclear da célula pela interação com a dineína (HU e KOPECKO, 1999).

Deun et al. (2008) concluiu que o mecanismo de invasão parece ser cepa e linhagem de célula dependente. Após estudar diferentes células e linhagens celulares os autores verificaram que enquanto a invasão de algumas foi microtúbulo dependente, em outras foi microtúbulo e actina dependente e outras não são afetadas por esses dois componentes do citoesqueleto.

Após 10 minutos de inoculação de *C. jejuni* em células Caco-2, o flagelo se liga aos microtúbulos localizados próximos a zôntula de oclusão (HU et al., 2008). A bactéria entra na célula pela profusão de membrana e interioriza em endossomo (HU et al., 2008; WATSON e GALAN, 2008). *C. jejuni* sobrevive dentro desses endossomos e evitam a fusão com lisossomos (WATSON e GALAN, 2008).

Em geral, os patógenos bacterianos têm diferentes estratégias para sobrevivência intracelular. Eles podem escapar da defesa do hospedeiro impedindo a acidificação e/ou fusão de endossomas com lisossomos; podem sair do fagossomo obtendo acesso ao citoplasma tornando-se resistentes à morte pela célula hospedeira; podem inibir ou manipular a biologia das células hospedeiras em seu benefício ou usar as células para atingir tecidos mais profundos. O destino intracelular de *C. jejuni* é ainda mal compreendido. Em células INT-407, *C. jejuni* permanece no interior de um vacúolo dependente dos microfilamentos. Nesse vacúolo a bactéria é capaz de se replicar, após um declínio inicial do número de bactéria intracelular. A replicação da bactéria resulta no enfraquecimento da monocamada das células epiteliais (KONKEL *et al.*, 1992). A aquisição de ferro é essencial para a sobrevivência intracelular nessa linhagem celular (NAIKARE et al., 2006).

A partir dos trabalhos de Bacon et al. (2000) e Bacon et al. (2002) foi verificado que o plasmídeo também parece estar envolvido no processo de virulência. O seqüenciamento do plasmídeo da *C. jejuni* revelou a seqüência do pVir. Essa seqüência do plasmídeo é

encontrada em alguns isolados de *C. jejuni*, e análise por mutação demonstra que 5 proteínas codificadas pelo plasmídeo tem papel na invasão *in vivo* em células epiteliais INT-407 (BACON et al., 2002). Uma das proteínas assemelham-se aos componentes do sistema de secreção tipo IV que em outras bactérias patogênicas, está envolvido com a exportação do DNA, conjugação e secreção de proteínas (CHRISTIE e VOGEL, 2000; CHRISTIE et al., 2001) demonstrando o papel da invasão e patogenicidade (BACON et al., 2002). Contudo, a transferência do pVir para outras cepas menos invasivas não resulta em um aumento na capacidade de invasão (BACON et al., 2002). Tracz et al (2005) sugere que a presença do pVir está associado a diarréia sanguinolenta porém, Louwen et al. (2006) afirma que não há associação entre pVir e sintomas de diarréia sanguinolenta.

#### **2.4.3. Mecanismo de secreção e produção de toxinas por *Campylobacter jejuni***

*Campylobacter jejuni* também possui mecanismos de secreção embora, ainda pouco estudada quando comparada a outras bactérias patogênicas. Uma importante proteína secretada por *C. jejuni* é a CiaB, que está envolvida com a invasão em culturas de células epiteliais (KONKEL et al., 1999). Em aves, a secreção de CiaB também parece ser importante para o processo de invasão já que bactérias mutantes com deleção de CiaB exibem menor colonização (ZIPRIN et al., 2001).

O mecanismo da secreção da CiaB e seu papel na invasão parecem estar associados ao sistema de secreção tipo III (KONKEL et al., 1999; RIVERA-AMILL et al., 2001). Mas *C. jejuni* parece não codificar o sistema de secreção tipo III e evidências para direta secreção de CiaB ainda não existe. O aparato flagelar da *C. jejuni* também secreta outra proteína denominada de FlaC, que também é requerida para a invasão e tem pouca homologia com as flagelinas maior e menor (FlaA e FlaB). FlaC não é requerida para formação ou motilidade do flagelo. Contudo, a proteína se liga a células HEp-2 quando secretada pela bactéria *in vivo* após a infecção ou quando utilizado a proteína recombinante. Inativação de FlaC leva a redução na invasão de *C. jejuni* em culturas epiteliais mas não afeta a aderência (SONG et al., 2004)

*Campylobacter* passa pelo muco e interage com as células epiteliais. A síntese da proteína Cia é estimulada pelos componentes biliares embora a secreção da Cia não seja. Isto leva a sugerir que a produção da Cia pode ser estimulada precocemente durante a colonização no intestino delgado, mas que a secreção ocorre apenas após a aderência no local da colonização (RIVERA-AMILL et al., 2001).

Assim como outras bactérias, como por exemplo *E. coli*, *C. jejuni* produz uma “Cytolethal distending toxin” ou toxina citoletal distensora (CDT). A CDT é codificada por três genes adjacentes, cdtA, cdtB e cdtC, sendo que a expressão das três subunidades são requeridas para uma plena atividade da toxina (JEON; ITOH; RYU, 2005). Atuais evidências indicam que o gene cdtB codifica a atividade e toxicidade dos componentes da toxina, enquanto que os genes cdtA e cdtC estão envolvidos na aderência e interiorização na célula hospedeira (ABUOUN et al., 2005).

Martinez et al. (2006) verificou que CDT afeta as células epiteliais, causando progressiva distensão e morte em várias linhagens celulares pelo acúmulo intracelular dos níveis de cAMP. Segundo Smith e Bayles (2006) depois de internalizada, a proteína CdtB entra no núcleo e exibe uma atividade semelhante à DNase-I, resultando em cortes no DNA dupla fita. Com os cortes no DNA há bloqueio na fase G2/M da divisão celular, induzindo uma distensão citoplasmática (JEON; ITOH; RYU; 2005; SMITH; BAYLES, 2006) que leva a apoptose celular com fragmentação do DNA (JAIN et al., 2009)

Dependendo da célula eucariótica afetada, CDT pode contribuir para a patogênese pela inibição da imunidade humoral e celular, via apoptose de células de resposta imune, e por provocar necrose do epitélio celular e fibroblastos envolvidos na reparação de lesões produzidas por patógenos, resultando em lenta cicatrização e indução dos sintomas da doença (SMITH; BAYLES, 2006). Hickey et al. (2000) verificaram que além do processo de invasão e aderência, a liberação de IL-8 pode ser consequência da ação da CDT.

Todas essas ações da CDT interferem na divisão e diferenciação das células nas criptas intestinais, contribuindo para o desenvolvimento da diarréia (WASSENAAR, 1997; PARK, 2002). Sendo assim, a toxina CDT pode funcionar como um fator de virulência em patógenos que produzem essa toxina, desde que os genes estejam ativos (SMITH; BAYLES, 2006).

*C. jejuni* expressa a CDT em aves, mas diferente do que ocorre em humanos a neutralização de tal toxina por anticorpos não foi evidenciada em aves (ABUOUN, et al., 2005).

## 2.5. *Campylobacter jejuni* em aves e humanos

*Campylobacter jejuni* é a principal causa de enterite humana em países desenvolvidos (EFSA, 2009). Campylobacteriose é frequentemente transmitida por alimentos principalmente pelo consumo de carne de frango. Nesses animais, a colonização por *C. jejuni* não resulta em sintomas clínicos e dependendo do país, 20 a 100% dos lotes podem ser positivos no abatedouro (JACOBS-REITSMA, 2000).

Evidências em estudos epidemiológicos, como do tipo caso controle e investigações moleculares, suportam a idéia de que há relação entre contaminação por *Campylobacter* em humanos e aves e que as cepas de *Campylobacter* encontradas em aves e humanos são similares (MILLER et al., 2006; SHEPPARD et al., 2009; WASSENAAR et al., 2009). Há uma grande diversidade de cepas de *C. jejuni* isoladas de lotes de frangos e estas cepas variam principalmente pela habilidade de sobreviver ao estresse ambiental e as propriedades de virulência como a invasividade e a produção de toxinas (WASSENAAR ,1997; CARRILLO, 2004)

De acordo com Ketley (1997), a infecção entérica por *Campylobacter* normalmente leva a diarréia, que em países industrializados se manifesta mais freqüentemente como uma diarréia inflamatória com severas contrações, principalmente em adultos jovens e crianças, mas também em pessoas mais velhas. Nesses países a infecção parece ser sazonal. Em países em desenvolvimento há um alto índice de pessoas assintomáticas, sintomas clínicos brandos de diarréia não inflamatória são usualmente visto em crianças, sendo que não é percebida a sazonalidade. Especula-se que essas diferenças estão associadas principalmente com a múltipla exposição de cepas muito cedo e consequentemente a aquisição de imunidade nos países em desenvolvimento.

Baixas doses da *C. jejuni* (500 a 800UFC) podem ser suficientes para levar a gastroenterite em humanos (BLACK et al., 1988). As infecções em indivíduos que nunca foram expostos ao agente *C. jejuni* é geralmente seguida por dor abdominal aguda após um a sete dias e frequentemente acompanhada por febre e indisposição. Os sintomas progridem para diarréia, que posteriormente terá a presença de muco e sangue. A doença é usualmente limitada a um período de cinco a oito dias, mas a excreção da bactéria pode persistir após o fim dos sintomas clínicos.

De forma curiosa, o DNA de *C. jejuni* foi encontrado no sangue circulante de pessoas saudáveis e pacientes com GBS, embora nenhuma célula viável tenha sido detectada. Isso pode indicar ou a presença de VNC ou que *Campylobacter* reside em um nicho ainda não identificado dentro de humanos servindo como reservatório para infecção contínua (VAN RHIJN *et al.*, 2002).

Análises patológicas em tecidos de pacientes que morreram com enterite por *C. jejuni*, mostraram inflamação hemorrágica e congestão no jejun e a na primeira metade do íleo. Biopsia no colon indica difusão e infiltração de neutrófilos na lâmina própria com abscessos superficiais nas criptas e alterações histopatológicas semelhantes às colites induzidas por *Salmonella* e *Shigella* (LI, 2000).

*Campylobacter jejuni* é a causa mais comum de SGB e parece haver uma associação entre a infecção por *C. jejuni* e a neuropatia axonal motora aguda, mas não com a polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (KUWABARA *et al.*, 2004), contudo esses achados ainda não foram avaliados por outros autores.

Há certa dificuldade no uso de modelos animais para detalhar a doença clínica causada por *Campylobacter* em humanos. Vários modelos murinos são usados, mas os resultados parecem ser ainda inconsistentes, pois embora a inflamação e outros indicadores patológicos sejam observados, os sintomas clínicos não são bem representados por esses modelos (FOX *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 1994; Mansfield *et al.* 2007). Em coelhos, a *C. jejuni* foi encontrada associada a células M (EVEREST *et al.*, 1993), sugerindo que esse tipo celular pode ser uma importante porta de entrada. Especula-se que em baixa dose do inóculo (500-800 bactérias) *C. jejuni* pode explorar primariamente as células M para atravessar o epitélio. Em contraste, altas doses do inóculo, pode levar a invasão das células epiteliais, talvez como um evento secundário após a perda da integridade das zônulas de oclusão (EVEREST, 2005, CHEN *et al.*, 2006).

Apesar de a ingestão da carne de frango ser a principal causa de campilobacteriose em humanos, a bactéria parece ter uma relação comensal com as aves (RUIZ-PALACIOS *et al.*, 1981; KOROLIK *et al.*, 1998; STAS, 1999; YOUNG *et al.*, 1999), embora a infecção experimental possa levar à diarréia em frangos (SANYAL *et al.*, 1984). Segundo Jacobs-Reitsma (2000), mesmo assintomáticos, lotes de frango podem apresentar 20 a 100% de prevalência de *C. jejuni* no momento do abate dependendo da época do ano e do país.

O nível de colonização por *C. jejuni* pode atingir a  $10^8$  UFC por grama de conteúdo intestinal em aves assintomáticas (DHILLON *et al.*, 2006). Em pintos de um dia, Knudsen et

al. (2006) verificaram que apenas 2 UFC é suficiente para levar a colonização e em aves de 14 dias aproximadamente 200 a 1000 UFC.

Apesar da alta prevalência de *C. jejuni* em frangos, os animais não mostram sinais de doença. As bactérias preferencialmente se localizam no muco dentro das criptas em estreita proximidade com as células epiteliais, mas aparentemente não aderem ou invadem o tecido intestinal. Além disso, a inflamação intestinal parece estar ausente nas aves colonizadas (BEERY et al., 1988, MEINERSMANN et al., 1991).

A origem da presença da *C. jejuni* em ovos é discutida e pouco se sabe ainda sobre a relação do ovo e a transmissão vertical. Muitas pesquisas mostram que a bactéria está restrita ao exterior dos ovos (JONES et al., 2006; JONES e MUSGROVE, 2007), mas já houve isolamento no conteúdo interno de ovos que eram negativos em seu exterior (ADESIYUN et al., 2005).

Embora estudos mostrem que a transmissão pela via transovariana seja possível (CAMARDA et al., 2000; BUHR et al., 2002, 2005; HIETT et al., 2002; SAHIN et al., 2003; COX et al., 2004), essa ainda não é considerada importante na disseminação do patógeno e poucos trabalhos mostram a passagem da bactéria pelos poros da casca do ovo.

Há uma grande diversidade de cepas de *C. jejuni* encontradas em lotes de frango. Essas cepas, tanto variam na habilidade de sobreviver ao estresse ambiental quanto nas propriedades de virulência como a invasividade e a indução da expressão de citocinas (WASSENAAR, 1997; CARRILHO et al., 2004).

A diferença entre a patologia em humanos e aves pode estar relacionada com a resposta imune. Estudos mostram que *C. jejuni* pode invadir cultura de células epiteliais de humanos e induzir a produção de citocinas e quimiocinas durante a infecção (AL-SALLOOM et al., 2003; SMITH et al., 2005).

Li et al.(2008) usando cultura de células primárias de intestino de aves SPF observou que tanto a cepa de *C. jejuni* de origem humana com sintomas clínicos como de aves pode invadir essas células, sendo que a percentagem de invasão é gradualmente aumentada até 4 horas pós inoculação com um declínio 24 horas pós inoculação. Ao comparar as duas cepas perceberam que a cepa de origem humana tem maior percentagem de invasão nos primeiros tempos (1 e 2 horas) pós inoculação.

*C. jejuni* pode sobreviver dentro das células por períodos relativamente longos em fagócitos e células epiteliais (KIEHLBAUCH et al., 1985; KONKEL et al., 1992) e a fagocitose pode promover a sobrevivência de *C. jejuni* (KIEHLBAUCH et al., 1985), mas a

bactéria ainda não é definida como um patógeno intracelular facultativo. Diferente do que ocorre em humanos, *C. jejuni* coloniza o trato intestinal da maioria dos mamíferos e também das aves com baixo ou nenhum nível de patologia (NEWLL e FEAMLEY, 2003).

Ainda não é claro qual o fator primário determina a sobrevivência da *C. jejuni* dentro da célula. A sobrevivência intracelular pode aumentar a capacidade de *C. jejuni* de escapar do sistema imune do hospedeiro, favorecendo a persistência da infecção (HICKEY et al., 1999).

Byrne et al. (2007) cita que ceco das aves são bolsas encontradas nas junções ileal e esse ambiente é similar ao colon humano onde é o local predileto de ação da bactéria.

Estudos mostram a importância do flagelo e a motilidade flagelar no processo de colonização em aves (HENDRIXON et al., 2004). Além do flagelo e outros sistemas reguladores, outro fator que pode estar relacionado à colonização de aves por *C. jejuni* é a temperatura de 42°C. Perfil de transcrição de culturas de *C. jejuni* transferidas de 37°C para 42°C mostrou alterações potenciais na estrutura da membrana pela regulação de genes para transporte e para proteínas de transporte e de ligação e também para os constituintes de parede e envelope (BRAS et al., 1999). Parece haver um sistema regulador que permite a sobrevivência da bactéria em alta temperatura. Esse sistema é denominado RacRs e é requerido para cepas selvagens na colonização em aves. Mutantes com o gene para RacRS deletado tem problemas no crescimento a 42°C (MACKICHAN et al., 2004).

Alguns genes que controlam mecanismos como motilidade e regulação gênica (KAKUDA et al., 2006) também são importantes para colonização em aves. Isto inclui os genes que codificam as enzimas responsáveis pela glicolização de várias proteínas e os fatores de aderência como CadF e CiaB (ZIPRIN, 2001).

## 2.6. Resposta imune intestinal a *Campylobacter. jejuni*

O trato intestinal dos invertebrados depende tanto da imunidade inata como adaptativa para limitar a entrada de patógenos para o interior da mucosa intestinal ou para a corrente sanguínea (DANN e ECKMANN, 2007). Deun et al. (2008) estudando o ceco de frangos, observaram que *C. jejuni* é capaz de invadir, evadir e re-invadir as células sem causar necrose, apoptose, lise celular e nenhuma inflamação na parede intestinal e também se transloquem para o fígado e o baço e se multiplicar no muco da parede intestinal. Esses achados levaram os autores a sugerirem que a *C. jejuni* deve usar um mecanismo de colonização no qual seja capaz de evitar ser expelida do intestino das aves pela invasão e evasão temporária das criptas

das células e persistência pela rápida multiplicação no muco. Sendo assim, capaz de manipular a resposta imune para evitar a inflamação destrutiva do intestino o que é similar à modulação feita por algumas bactérias comensais.

Durante as primeiras semanas de vida das aves, quando o sistema imune inato está em desenvolvimento, a exposição de baixas doses de bactérias pode levar ao recrutamento de heterófilos e linfócitos, e liberação de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8 e K203 (BAR-SHIRAH e FRIEDMAN, 2006). Porém, ainda durante as duas primeiras semanas de vida, anticorpos maternos podem estar presentes nos pintinhos desencadeando uma proteção para colonização por *C. jejuni* (SAHIN et al., 2001). Tais anticorpos podem reconhecer os componentes de superfície como LOS, MOMP e flagelina (CAWTHRAW et al., 1994), levando a morte de *C. jejuni* mediada pelo complemento. Assim, para que haja colonização precoce em aves, *C. jejuni* deve escapar da resposta imune inata dos jovens e da presença dos anticorpos maternos. A partir de duas semanas de idade os anticorpos maternos já não estão mais presente e com 3 semanas de idade, as aves começam a produzir seus próprios anticorpos principalmente contra a flagelina (CAWTHRAW et al., 1994; JEURISSEN et al., 1998).

As aves possuem uma resposta incompleta das células T independentes tipo 2 (TI-2) aos抗ígenos em geral, normalmente polissacarídeos. Assim, embora a capsula seja uma estrutura fortemente antigênica, a resposta humoral a esse polissacarídeo é fraca (JEURISSEN et al., 1998). Antígenos TI-2 ativam células B independentemente de células T, provavelmente por causa da sua habilidade em se ligar nas imunoglobulinas na superfície celular. Esta resposta TI-2 não efetiva nas aves pode contribuir para a colonização de *C. jejuni* nesses animais. Em humanos há anticorpos produzidos contra CDT, mas no frango, embora a *C. jejuni* expresse CDT, anticorpos neutralizantes não são produzidos (McNALLY et al., 2006).

Receptores TLRs provavelmente são os primeiros desafios imunológicos para *C. jejuni* durante a infecção. A resposta primária para *C. jejuni* é do tipo TH1 e provavelmente envolve células dendríticas (DCs) e macrófagos (FOX et al., 2004; HU et al., 2006; ALSALLOOM, 2003). Fox et al. (2004) mostraram *in vivo* que a imunidade contra um mutante cdtB de *C. jejuni* foi mediada por TH1 dependente da resposta de IgG2.

O papel dos monócitos e macrófagos na infecção por *C. jejuni* não é claro porque os resultados variam de acordo com a linhagem celular. Tanto NF- $\kappa$ B e a citocina proinflamatória IL-1 $\beta$  são induzidas por monócitos THP-1 estimulados com *C. jejuni*, o que

aumenta a evidência que monócitos também tem um papel na inflamação durante a infecção (HICKEY et al., 2005; WASSENAAR et al. 1997b).

Para Hickey et al. (2005) e Day et al. (2000), *C. jejuni* é capaz de sobreviver por vários dias em macrófagos peritoneais de murinos e linhagens celulares de macrófagos J774A.1. Porém, um relato mais antigo mostra que *C. jejuni* é morta por macrófagos derivados de monócitos humanos (KIEHLBAUCH et al., 1985).

Embora um múltiplo nível de variação existente nas estruturas de superfície da *C. jejuni* possa ajudar na evasão da resposta a anticorpos, uma resposta imune adaptativa foi demonstrada durante a infecção por *C. jejuni*. Anticorpos para vários componentes bacterianos foram observados no soro humano incluindo anti flagelar, MOMP (proteína de membrana externa), outras proteínas de membrana e LOS (GUERRY et al, 2000).

A indução de citocinas pro inflamatórias e antiinflamatórias é importante na determinação do sucesso da proteção específica contra patógenos no organismo (HENDERSON et al., 1998; KIDD, 2003). IL-8 é uma citocina pro inflamatória, um potente fator quimiotáxico para muitas células imunes efetoras e um mediador da resposta inflamatória localizada (WUYTS et al., 1998).

Em aves e mamíferos o TGF- $\beta$  tem um papel imunorregulador. Uma das primeiras interleucinas caracterizadas em aves foi a IL-6. Ela é produzida precocemente após a infecção como parte da resposta imune inata (SHNEIDER et al, 2001). A sua importância como citocina pro inflamatória parece estar ligado concomitante aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  induzem a produção de IL-6 (HENDERSON et al., 1998).

Li et al. (2008) verificaram que cepa de origem humana e de frango de *C. jejuni* pode induzir a produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCLi1, CXCLi2, mas não de TGF- $\beta$ 4), iNOS e NO (óxido nítrico) em células intestinais primárias de embriões de aves SPF. O aumento dessas citocinas e de NOS são características de doenças inflamatórias. *C. jejuni* é capaz de induzir a expressão de citocinas pro inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 e quimiocina pro inflamatória IL-8 em macrófago de aves (SMITH et al., 2005).

A resposta das células intestinais a *C. jejuni* está geralmente caracterizada pela indução de citocinas, como a IL-8, que é uma citocina proinflamatória que é característica na campilobacteriose. Porém essa resposta parece ser cepa dependente (HICKEY et al., 2005). Em células Caco-2, células T84 e explantes intestinais humanos a infecção por *C. jejuni*

resulta na ativação das proteínas da família MAP kinase ER K e p38 (WATSON et al., 2005, MACCALLUM et al., 2005) que para células T84 essa ativação é essencial para a estimulação da IL-8 (WATSON e GALAN, 2005).

Larson et al. (2008) durante ensaios de adesão e internalização, verificaram que *C. jejuni* é significativamente menos invasiva em células LMH de frango se comparadas às células humanas INT 407, apesar de igual ligação das bactérias a cada espécie de célula hospedeira. Esses autores, também avaliaram a transcrição e secreção de IL-8 nos dois tipos celulares antes citados, e concluíram que inoculação de células LMH com *C. jejuni* estimula a expressão de IL-8 e CXCLi2, mas em níveis significativamente inferiores que nas células de humanos. Zheng et al. (2008) também verificou a secreção de IL-8 em linhagens de células humanas infectadas com *C. jejuni*.

## **Capítulo I**

Caracterização da cepa de *Campylobacter jejuni* IAL 2383 isolada de humanos quanto a virulência, termotolerância e resistência a antimicrobianos

## Resumo

A interação patógeno-hospedeiro de *C. jejuni*, uma bactéria de grande importância em zoonoses alimentares, parece ser cepa dependente. Assim esse trabalho objetivou caracterizar a cepa de *C. jejuni* IAL2383 quanto à presença e expressão de transcritos dos principais genes de virulência para aves e humanos, a termotolerância e a resistência a antimicrobianos. Para isso foi realizado PCR para verificar a presença dos genes associados à aderência e invasão *flaA*, *plda* e *cadF*. A presença dos transcritos dos principais genes relacionados com a colonização em aves (*racR*), termotolerância (*dnaJ*) e invasão (*ciaB*) foi evidenciada por *rtPCR*. A resistência aos principais antimicrobianos foi determinada por difusão em disco e a termotolerância por cultura convencional. A bactéria apresentou e expressou todos os genes de virulência avaliados e cresceu a temperatura de 41<sup>0</sup>C em quantidade superior comparada a temperatura de 37<sup>0</sup>C. Apesar de virulenta, a cepa apresentou boa resposta a antibióticos com resistência apenas a trimetropim (5 $\mu$ g) e cefoxitina (30mg) e sensível aos principais antibióticos relacionados com a geração de superbactérias. Os resultados desse trabalho indicaram que a cepa *C. jejuni* IAL2383 isolada de humanos com sintomas clínicos e mantidas na biblioteca de culturas do Instituto Adolfo Lutz é uma estirpe que pode ser utilizada como modelo experimental para verificar a interação tanto com células humanas como em células de aves.

Palavras chaves: virulência, modelo experimental, termotolerância, *Campylobacter jejuni*

## Abstract

The objective of this study was to characterize *C. jejuni* IAL2383 strain to virulence gene presence, expression of virulence genes, level of thermotolerance and antimicrobial resistance profile. We used PCR from genomic DNA to verify the existence *flaA*, *plda* e *cadF* and rtPCR to verify the gene expression of *racR* responsible for avian colonization, *dnaJ* involved with Thermal Stress and *ciaB* associated with invasion. Antimicrobial resistance profile was evaluated by disks diffusion. The bacterium expressed and show all virulence gene and grew in 37°C and 41°C. Despite virulent *C. jejuni* was sensible to the most of important antimicrobial used to public health. The findings indicated that the *C. jejuni* IAL2383 isolated from humans with clinical symptoms is a strain that can be used as an experimental model to verify the interaction with both human cells and in cells of birds.

Key words: virulence, experimental model, thermotolerance, *Campylobacter jejuni*

## 1. Introdução

A diversidade de *C. jejuni* se reflete na capacidade de colonização e na causa potencial de doenças. A variação nos fatores de virulência de diferentes estirpes foi observada tanto *in vitro* quanto em modelos *in vivo*, demonstrando diferentes estratégias e consequentes riscos. A compreensão da base molecular dos padrões de virulência das cepas isoladas associada às consequências biológicas da diversidade genética entre as linhagens é de suma importância para o controle da doença (AHMED et al., 2002).

A capacidade de causar doença por espécies e cepas de *Campylobacter* não é homogênea e está relacionada a fatores intrínsecos de patogenicidade. Estudos de tipagem molecular relataram uma sobreposição entre genótipos de *Campylobacter* oriundos de produtos cárneos causando infecção em humanos (HÄNNINEN et al., 2000; WILSON et al., 2008).

Fatores de virulência relacionados com a capacidade de *Campylobacter* aderir e invadir células epiteliais foram associados à presença e expressão dos genes *flaA*, *cadF*, *ciaB* e *pldA* (RIVERA-AMILL et al., 2001; HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006). Os genes *flaA*, *ciaB*, *cadF* e *pldA* são referência no estudo dos mecanismos de patogenicidade de *Campylobacter jejuni* (HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006). Esses genes codificam proteínas envolvidas na adesão e na capacidade invasiva de *Campylobacter jejuni*.

Além dos fatores de virulência é importante conhecer a resistência a antimicrobianos e essa resistência é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), juntamente com várias outras autoridades, como um dos principais problemas emergentes de importância para a saúde pública (MOORE et al., 2006). Outro fator a ser considerado é o grau de termotolerância que cada cepa exibe.

Os mecanismos de interação *C. jejuni*-célula hospedeira ainda não são bem compreendidos e há grande divergência entre os pesquisadores. Talvez essa variação possa ser explicada pela diferença entre cepas encontrada por alguns autores (DEUN et al., 2008; LI et al., 2008). A cepa de *Campylobacter jejuni* IAL2383 foi isolada de humanos com sintomas clínicos no Brasil e é de propriedade da biblioteca de cepas do Instituto Adolfo Lutz. Essa estirpe parece ser ideal para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro por ter causado sintomatologia em humanos no Brasil. No entanto, ainda não foram estabelecidas as

características dessa cepa quanto aos fatores de virulência, grau de termotolerância e resistência a antibióticos.

Diante da problemática encontrada acerca das divergências da relação patógeno hospedeiro e epidemiologia em muitas publicações, o conhecimento das características da cepa de *C. jejuni* utilizada para os experimentos científicos em células e animais *in vivo* e *in vitro* permite o melhor entendimento dos resultados encontrados.

## **2. Objetivos**

Caracterizar a cepa IAL2383 quanto à presença e à expressão de transcritos dos principais genes de virulência para *Campylobacter jejuni*, à temperatura de crescimento e à resistência a antimicrobianos.

## **3. Material e Métodos**

Para o estudo foi utilizada a cepa *C. jejuni* (IAL 2383), previamente isolada de humanos em um surto, mantida no Banco de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (IAL).

### **3.1. Antibiograma**

Foram realizadas provas de resistência a antimicrobianos para a cepa IAL2383 pelo método de Kirby-Bauer de difusão com disco (BAUER; KIRB; SHERRIN, 1966), utilizando protocolo recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). Os seguintes antibióticos foram utilizados nas respectivas concentrações trimetropim (5 $\mu$ g), cefoxitina (30mg), cefitiofur (30mg), neomicina (30mg), cloranfenicol (30mg), sulfametazol-trimetoprim (23mg), amoxilina, tetraciclina, gentamicina, ácido nalidixico, norfloxacina, enrofloxacina, sulfazotrim e eritromicina. As análises foram feitas em triplicada em ágar Mueller Hinton com 5% de sangue de equino hemolizado e incubadas em temperatura de 37 $^{\circ}$ C graus por 48 horas em atmosfera de microaerofilia.

### 3.2. Temperatura de crescimento

Para verificar se há influencia da faixa de temperatura ótima para o crescimento da *C. jejuni*, sobre o crescimento bacteriano da cepa IAL2383, uma alçada da bactéria foi colocada em 10mL de solução salina e após, foram realizadas 9 diluições seriadas. Uma alíquota de 0,1mL das diluições de 6 a 9 vezes foi retirada e colocada em superfície de ágar CCDA sem antibiótico e homogeneizada com alça de Drigalski. Para cada diluição foram estriadas placas em triplicata para as temperaturas de 37<sup>0</sup> e 41<sup>0</sup>C em paralelo. Após 30 horas de incubação, em atmosfera de microaerofilia, as bactérias foram quantificadas.

### 3.3. Presença dos genes de virulência

Para verificar se a cepa IAL2383 possui os genes de virulência *cadF*, *pldA* e *flaA* foram utilizados *primers* já descritos na literatura (tabela 1). Como controle positivo foi utilizado a cepa de *C. jejuni* NCTC 11351 LABIO-UFU.

O processo de extração de DNA foi de acordo com o descrito por Guo et al. (2000) e Borsoi et al. (2009) modificado. Para isso, 1mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 13.500xg por 2min em microcentrífuga refrigerada (CIENTEC®) descartando o sobrenadante. O pellet foi ressuspensionado em 800µL de água destilada estéril e a mistura centrifugada a 13.500g por 2min. O sobrenadante foi descartado e o pellet novamente ressuspensionado em 200µL de água destilada estéril. As amostras foram mantidas em termobloco (DuPont®) a temperatura de 95°C por 10min. Após extração, o DNA foi quantificado por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm.

O volume final para a reação de amplificação (50µL) foi composto por 20ng da solução de DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 5,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 30 picomoles para cada primer e 1,25U de Taq DNA polimerase. Cada gene foi estudado separadamente nas reações. Após, os microtubos foram colocados em um termociclador (eppendorf) obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial a 95°C por 10 minutos; 35 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Ao término da reação, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de *syber safe* (Invitrogen Brasil Ltda), submetidos a uma

voltagem de aproximadamente 8V/cm e, posteriormente, visualizado por luz UV em um transluminador (L.PIX Loccus biotecnologia). Os tamanhos dos produtos amplificados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores para identificação dos genes de virulência *flaA*, *cadF* e *pldA* de *Campylobacter jejuni*.

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>flaA</i>	flaA-F	ATGGGATTCGTATTAACAC	1728	Hänel et al. (2004)
	flaA-R	CTGTAGTAATCTTAAACATTTG		
<i>cadF</i>	cadFI-F2B	TTGAAGGTAATTAGATATG	400	Zheng et al. (2006)
	cadFI-R1B	CTAATACCTAAAGTTGAAAC		
<i>pldA</i>	pldA-361	AAGAGTGAGGCGAAATTCCA	385	Zheng et al. (2006)
	pldA-726	GCAAGATGGCAGGATTATCA		

### 3.4. Presença dos transcritos dos genes de virulência

Foram realizados ensaios para verificar se a cepa IAL2383 possui os transcritos dos genes de virulência *ciaB*, *dnaJ* e *racR* (LI et al., 2008) (tabela 2). Para isso, colônias do crescido bacteriano de 3 placas foram retiradas e extraído o RNA pelo método do Trizol Reagent® (INVITROGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. As células bacterianas foram adicionadas a 1mL de trizol e após a 0,2mL de clorofórmio e centrifugadas a 20.500xg a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um microtubo e adicionada a 0,5mL de isopropanol, homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, centrifugada a 20.500xg por 10min a 4°C. O pellet foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 7.500xg a 4°C e após secado e ressuspêndido em água DEPC para posterior quantificação por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm.

Após extração do RNA, foi realizado ensaio de transcrição reversa para síntese da primeira fita cDNA. Nessa reação foram utilizados 1 µg de RNA total (200ng/uL), 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de tampão

da MMLV-RT (*Amersham Biosciences*), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20 µl com água tratada com DEPC. A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 1 hora. Reações controle foram utilizadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20°C para posterior amplificação.

Para verificar a presença dos transcritos de de virulência antes descritos, foi realizado a PCR convencional. Como controle positivo foi utilizado a cepa de *C. jejuni* NCTC 11351. Uma cepa de *Campylobacter coli* isolada de fezes de frango no LABIO-UFG de expressão de virulência desconhecida e células Caco-2 em contato com *C. jejuni* IAL 2383 foram utilizadas em paralelo. Como controle negativo, água foi utilizada água milique estéril. O volume final para a reação de amplificação (25µL) foi composto por 3µL da solução de cDNA e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dntp); 5mM de MgCl<sub>2</sub>; 4 picomoles para cada primer e 0,625U de Taq DNA polimerase. Cada gene foi estudado separadamente nas reações. Após, os microtubos foram colocados em um termociclador (eppendorf) obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial a 94°C por 3 minutos; 45 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 94°C por 15 segundos anelamento a 51°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 3 minutos. Ao término da reação, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de syber safe (Invitrogen Brasil Ltda), submetidos a uma voltagem de aproximadamente 8V/cm e, posteriormente, visualizado por luz UV em um transluminador (L.PIX Locus biotecnologia). Os tamanhos dos produtos amplificados estão descrito na tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores de transcritos de dos genes de virulência *ciaB*, *dnaJ* e *racR* utilizados para caracterizar a cepa IAL 2383.

Gene	Seqüência	Tamanho do produto amplificado	Referencia
<i>ciaB</i>	F: ATATTTGCTAGC AGCGAAGAG R: GATGTCCCCTTGTAAAGGTG	157	Li et al. (2008)
<i>dnaJ</i>	F: AGTGTGAGCTTAATATCCC R: GGCATGATCTAACATACA	117	Li et al. (2008)
<i>racR</i>	F: CTTAAGCGATAAAGTTGTGG R: CTTTTGTGCGACGAAT	114	Li et al. (2008)

#### 4. Resultados

A cepa de *C. jejuni* IAL 2383 foi sensível a todos os antibióticos a exceção do trimetropim (5 $\mu$ g), cefoxitina (30mg).

A bactéria cresceu melhor a temperatura de 41 $^{\circ}$ C sendo possível a contagem apenas a partir da diluição de 8 vezes. Na temperatura de 37 $^{\circ}$ C a média de crescimento foi de 8X10<sup>7</sup> UFC (DP=0,060), inferior a média de 2X10<sup>8</sup> (DP=0,242) para temperatura de 42 $^{\circ}$ C.

A cepa de *C. jejuni* IAL 2383 apresentou os genes de virulência *cadF*, *pldA* e *flaA* (figura 1). Tais genes, juntamente com *ciaB* são referência no estudo dos mecanismos de patogenicidade de *Campylobacter jejuni* (HÄNEL et al., 2004; ZHENG et al., 2006). A cepa também expressou todos os genes de virulência estudados *ciaB*, *dnaJ* e *racR*.

Os resultados Rt-PCR mostra que a bactéria apresenta transcritos codificados para proteínas *ciaB*, *dnaJ* e *racR* sem a necessidade de contato com células eucariontes (figura 2).

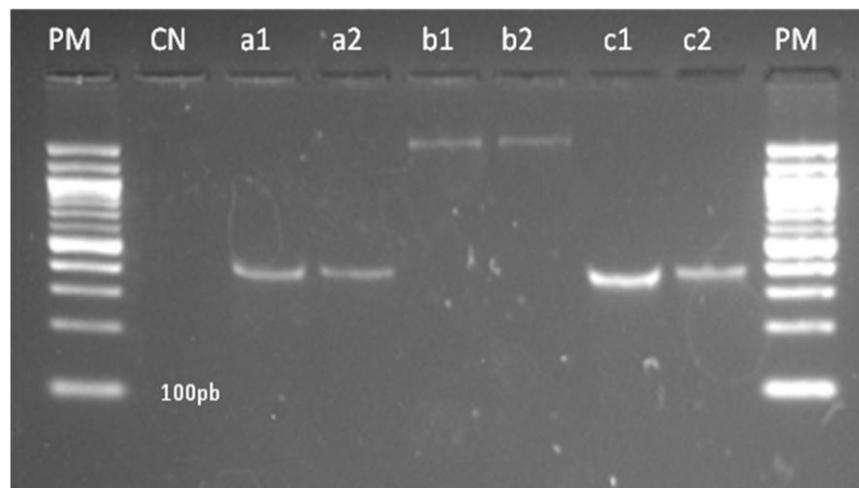


Figura 1- PCR para presença dos genes *cadF*, *flaA* e *pldA* para cepa IAL 2383 de *C. jejuni*. PM=marcador de massa molecular (100pb). CN: controle negativo, a.1: gene *cadF* cepa de *C. jejuni* NCTC 11351, a.2: gene *cadF* cepa de *C. jejuni* IAL 2383, b.1: gene *flaA* cepa de *C. jejuni* NCTC 11351, b.2: gene *flaA* cepa de *C. jejuni* IAL 2383, c.1: gene *pldA* cepa de *C. jejuni* NCTC 11351, c.2: gene *pldA* cepa de *C. jejuni* IAL 2383.

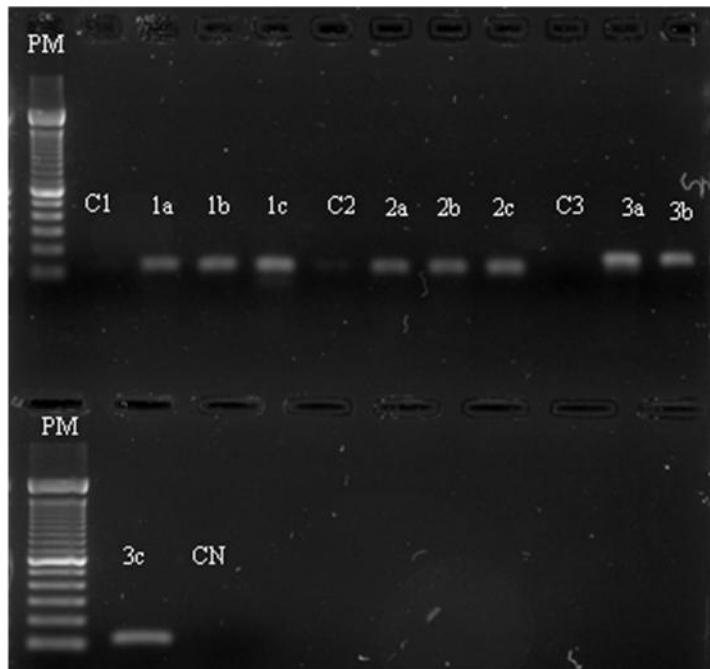


Figura 2- RT-PCR para presença de transcritos de de virulência *dnaJ*(1), *racR*(2) *ciaB*(3), e para cepa IAL 2383 de *C. jejuni*. PM=marcador de peso molecular (100pb). 1 (*dnaJ*) C1= Cepa de *C.coli* isolada de frangos, 1a = Cepa *C. jejuni* IAL 2383, 1b = Células Caco-2 infectadas com *C. jejuni* por 2 horas, 1c = Cepa *C. jejuni* NCTC 11351. 2 (*racR*) C2 = Cepa de *C.coli* isolada de frangos, 2a = Cepa *C. jejuni* IAL 2383, 2b = Células Caco-2 infectadas com *C. jejuni* IAL 2383 por 2 horas, 2c = Cepa *C. jejuni* NCTC 11351. 3 (*ciaB*) C3 = Cepa de *C. coli* isolada de frangos, 3a = Cepa *C. jejuni* IAL 2383, 3b = Células Caco-2 infectadas com *C. jejuni* IAL 2383 por 2 horas, 3c = Cepa *C. jejuni* NCTC 11351, CN: Controle negativo.

#### 4. Discussão

Esse resultado mostra que a cepa cresce a temperatura acima de 37°C, o que possibilita sua sobrevivência no interior das aves cuja temperatura varia entre 40 e 42°C (SESTI e ITO, 2000). Aliado a temperatura de crescimento, a presença dos transcritos dos genes *racR* e *dnaJ* indica que a cepa utilizada nesse trabalho pode colonizar o trato intestinal das aves, sendo assim, útil como modelo para avaliar a patogenia da *C. jejuni* nesses animais. Isso porque *racR* é um componente do sistema *racR* e *racS* (*reduced ability to colonize*) de regulação e está envolvido na habilidade em colonizar o trato intestinal de aves (BRÁS, et al., 1999) enquanto, o *dnaJ* codifica uma proteína do choque térmico que permite à bactéria crescimento em temperatura superiores a 40°C (KONKEL et al., 1998). A presença dos transcritos do gene *ciaB* por essa cepa é importante já que a secreção da proteína *ciaB* é de grande relevância para invasão tanto em células epiteliais como na mucosa intestinal de aves (KONKEL et al., 1999; ZIPRIN et al., 2001).

A presença desses genes de virulência indica a capacidade de adesão, invasão e internalização da cepa IAL2383. O gene *flaA* é necessário para a adesão e invasão nas células epiteliais (WASSENAAR et al., 1991). O *cadF* codifica uma proteína que interage com a fibronectina da matriz extracelular do hospedeiro, participando da colonização da superfície celular (MONTEVILLE et al., 2003). O gene *pldA* está relacionado à invasão celular e codifica uma proteína envolvida na síntese de fosfolipase da membrana externa (ZIPRIN et al., 2001).

A prova de resistência aos antimicrobianos indica que a cepa de *C. jejuni* IAL 2383 ainda apresenta boa sensibilidade a maioria dos antibióticos testados excluindo trimetropim (5 $\mu$ g) e cefoxitina (30mg). Muitas cepas de *C. jejuni* apresentam multiresistência a antimicrobianos (JONKER e PICARD, 2010; CHEN et al., 2011; SCHWEITZER et al., 2011), e para enterobactérias a resistência a fluoquinolonas e as cefalosporinas de terceira geração representa um dos maiores problemas para geração de superbactérias (PIGNATARI, 2011).

## 5. Conclusão

A cepa IAL não apresenta resistência aos principais antibióticos para enterobactérias, porém essa estirpe, apresenta e são capazes de produzir transcritos dos principais genes de virulência no genoma sendo um modelo útil para se avaliar a patogenia em frangos e humanos.

## **Capítulo II**

Transferência, viabilidade e colonização de  
*Campylobacter jejuni* em vitelos e embriões de  
aves

## Resumo

A passagem e a colonização de *C. jejuni* em embriões de aves é um tema muito pouco discutido. O objetivo desse estudo foi avaliar a habilidade de *C. jejuni* penetrar e colonizar ovos de aves SPF e reprodutoras pesadas, determinar os efeitos da bactéria sobre a viabilidade dos embriões e as alterações morfométricas em *explants* de intestino de embriões. Foi detectada passagem de *C. jejuni* em 10% de ovos de matrizes pesadas e 20% de ovos SPF. Isso demonstra a habilidade da bactéria passar pelos poros dos ovos e contaminar vitelos até 3 horas em contato do ovo com a maravalha contaminada. Em 80% dos embriões SPF avaliados, *C. jejuni* sobreviveu e se multiplicou durante todo o período de 21 dias de incubação e sua presença levou a uma alta mortalidade embrionária precoce. Além disso, a bactéria levou a um aumento do tamanho dos enterócitos de *explants* de embriões com 20 dias de idade. Esses resultados indicam que em determinadas circunstâncias a bactéria pode penetrar pelos poros das cascas dos ovos e levar a alta mortalidade embrionária precoce, bem como provocar alterações celulares em enterócitos de aves .

Palavras chaves: incubação, mortalidade embrionária, poro de ovos, *Campylobacter jejuni*

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the ability of *Campylobacter jejuni* to penetrate and colonise eggs from specific-pathogen-free (SPF) and heavy breeder hens, and to determine its effects on the viability of SPF embryos. We detected *C. jejuni* in 10% of breeder hens and 20% of SPF eggs, which demonstrates the ability of the bacteria to go through the pores of eggs and contaminate the vitellus after 3 h of contact. These results indicate that there is a risk of contamination under commercial production conditions, where, after oviposition, there is contact between the egg and organic material such as faeces and blood. We observed that in 80% of SPF eggs analysed, *C. jejuni* survived the 21-d incubation period. This positive result suggests that this microorganism was also responsible for early embryonic mortality. In addition, the bacteria led to an increase in the size of enterocytes of explants with embryos 20 days old. These results indicate that in certain circumstances the bacteria can penetrate the pores of the eggshells and lead to high early embryonic mortality, and cause cell changes in the enterocytes of birds.

Keywords: incubation, embryonic mortality, pore eggs, *Campylobacter jejuni*

## 1. Introdução

A *Campylobacter jejuni* parece ter uma relação comensal em aves e muito pouco se sabe sobre sua manutenção nos lotes de frango (KOROLIK et al., 1998; STAS, 1999; YOUNG et al., 1999). A disseminação de patógenos em lotes de frango via transmissão pelos ovos e contaminação no incubatório é relatada para espécies de *Salmonella*. Para *Campylobacter jejuni*, provavelmente devido a não existência de sintomas clínicos na ave adulta, a transmissão transovariana não é uma rota considerada importante ou mesmo, bem estudada. Outro fator negligenciado é o efeito da bactéria sobre a viabilidade dos embriões de aves.

Pesquisas mostram que *C. jejuni* está restrita no exterior dos ovos (JONES et al., 2006; JONES e MUSGROVE, 2007), mas já houve isolamento no conteúdo interno de ovos que eram negativos em seu exterior (ADESIYUN et al., 2005). Embora alguns estudos mostrem que a transmissão pela via transovariana seja possível (CAMARDA et al., 2000; BUHR et al., 2002, 2005; HIETT et al., 2002; SAHIN et al., 2003; COX et al., 2004, 2005), essa via ainda é não é considerada importante na disseminação do patógeno e poucos trabalhos mostram a passagem da bactéria pelos poros da casca do ovo.

O melhor entendimento da transmissão de *C. jejuni* pela via transovariana, assim como seus efeitos em embriões é útil para que se foque na real importância dessa rota na epidemiologia da *C. jejuni* em lotes de frangos.

## 2. Objetivos

Verificar a capacidade de *C. jejuni* penetrar pelos poros de ovos de reprodutoras pesadas e SPF e permanecerem viáveis em seu interior, além de determinar se a infecção pela bactéria é patogênica para embriões de aves SPF.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Passagem de *Campylobacter jejuni* para o interior dos ovos

Para verificar a passagem de *C. jejuni* para o interior dos ovos foi utilizada maravalha previamente esterilizada e artificialmente infectada com  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> de *C. jejuni* (IAL 2383). A cultura foi diluída em caldo Bolton suplementado com 5% sangue bovino hemolisado e utilizada para umedecer a maravalha. Para os grupos controles foi utilizada maravalha estéril e umedecida com caldo Bolton suplementado com 5% de sangue bovino hemolisado sem a presença da bactéria.

Foram utilizados um total de 1200 ovos, sendo 600 ovos provenientes de matrizes pesadas e 600 de aves SPF divididos em quatro grupos experimentais: 300 ovos de matrizes em contato com maravalha com  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> de *C. jejuni* (teste 1); 300 ovos de matrizes armazenados em maravalha sem a bactéria (controle 1); 300 ovos SPF armazenados em maravalha com  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> de *C. jejuni* (teste 2); e 300 ovos SPF armazenados em maravalha sem a bactéria (controle 2). Antes do início do trabalho, uma amostragem de 10 ovos foi avaliada quanto à presença da bactéria para confirmar a negatividade.

Os ovos dos diferentes grupos foram dispostos em recipientes individuais para cada tratamento. Foi utilizada a disposição em camadas, intercalando os ovos e a maravalha e manutenção à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}\pm2^{\circ}\text{C}$ ) até o momento das análises. Foram definidos três momentos para o processamento das amostras: 3 horas, 7 horas e 24 horas de contato. Em cada período, foram coletados os vitelos de 100 ovos controle e 100 ovos teste de cada grupo experimental para análise. Uma amostra da maravalha de cada um dos grupos foi retirada em cada um dos períodos pré-determinados para verificar a viabilidade da bactéria.

As amostras de vitelo e maravalha foram analisadas por meio do cultivo tradicional em placas e PCR em tempo real. Foi retirado 1 mL do vitelo de cada uma das amostras e adicionado a 9mL de caldo Bolton (Oxoid) e analisado imediatamente para investigar a presença de *C. jejuni* por real-time PCR. Em paralelo, essas amostras foram pré-enriquecidas em atmosfera de microaerofilia (Probac microaerobac generator) a temperatura de 37°C por 24 horas para posterior cultivo em meio sólido CCDA (Oxoid). A espécie bacteriana foi identificada pelo método de PCR multiplex (descrito no item 3.3). As amostras de vitelo foram fixadas em glutaraldeído 3% e depois lavadas com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, o vitelo foi centrifugado e adicionado a agar-agar 5% para processamento em Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).

### 3.2. Pesquisa de *Campylobacter* spp. – cultura convencional

As amostras foram pré-enriquecidas em caldo Bolton (Oxoid) e mantidas a temperatura de 37°C durante 24 horas em atmosfera de microaerofilia. Depois desse período, alíquotas foram semeadas em ágar CCDA (Oxoid) e 5% de sangue bovino hemolisado. As placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia (Probac microaerobic generator) em jarras para anaerobiose a 37°C por 48 horas. A cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 foi utilizada como controle positivo.

Colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Campylobacter* foram confirmadas pela coloração de Gram para verificar a morfologia em vírgula ou “asa de gaivota” e a espécie foi confirmada por técnica de PCR multiplex.

### 3.3) Identificação das espécies de *Campylobacter* sp por PCR-multiplex

As colônias suspeitas foram confirmadas por técnica de PCR multiplex. O processo de extração de DNA genômico foi de acordo com o descrito por Guo et al. (2000) e Borsoi et al. (2009) modificado. Para isso, 1mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 13.500xg por 2min em microcentrífuga refrigerada (CIENTEC®) descartando o sobrenadante. O pellet foi ressuspensionado em 800µL de água destilada estéril e a mistura centrifugada a 13.500xg por 2min. O sobrenadante foi descartado e o pellet novamente ressuspensionado em 200µL de água destilada estéril. As amostras foram levadas a um termobloco (DuPont®) e submetidas a 95°C por 10min. Após extração, o DNA foi quantificado por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm.

A amplificação foi realizada utilizando os conjuntos de primers I e II descritos por Gillespie et al. (2002): (conjunto I - gene *flaA* – *C. jejuni* e *C. coli* - produto de 460pb - pg 3 e pg 50; conjunto II - seqüência única de *C. jejuni* - 160pb - C1 e C4); 20ng de DNA e demais reagentes (INVITROGEN), descritos por Harmon et al. (1997). O volume final para a reação de amplificação (50µL) foi composto por 20ng/µL da solução de DNA bacteriano e pelos reagentes: 10mM de Tris-HCL; 50mM de KCl; 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 5,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 30 picomoles para cada primer e 1,25U de Taq DNA polimerase. Cada gene foi estudado separadamente nas reações. O controle positivo de *C. jejuni* (ATCC 33291) foi utilizado em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo composto por água ultrapura estéril.

Os componentes da reação foram amplificados no termociclador (eppendorf), obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos; 25 ciclos de amplificação, cada qual constituídos de 3 etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; completando com mais ciclo de extensão final do iniciador a 72°C por 7 minutos (Harmon et al., 1997). Ao término da reação, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de syber safe (Invitrogen Brasil Ltda), submetidos a uma voltagem de aproximadamente 8V/cm e, posteriormente, visualizado por luz UV em um transluminador (L.PIX Loccus biotecnologia).

### **3.4. Real-time PCR das amostras para verificar a presença da bactéria e contagem da *C. jejuni***

A *real-time* PCR foi realizado no BAX System de acordo as orientações do fabricante (User Guide, 2007). No laboratório, imediatamente após a chegada, as amostras de vitelo e maravalha coletadas em caldo Bolton, homogeneizadas e transferidas alíquotas de 5µL para microtubos (Bioexpress, USA) contendo 200µL de solução de lise. A mistura foi aquecida a 37°C por 20 minutos e 95°C por 10 minutos, e depois transferida para bloco de resfriamento (2°C a 8°C) durante 5 minutos. Após resfriamento, 30µL do lisado foi transferido para os tubos de PCR contendo os primers para *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, dNTPs, a Taq-DNA polimerase, corante fluorescente, controle positivo interno e demais reagentes necessários para a PCR. Os tubos foram transferidos para o termociclador/detector, onde o programa pré-estabelecido no *hardware* do equipamento foi executado. Ao final do ciclo de amplificação e detecção, o equipamento automaticamente liberou os resultados identificando a espécie e o número de UFC.g<sup>-1</sup>. A cepa ATCC 33291 de *Campylobacter jejuni* foi processada em paralelo e utilizada também como controle positivo.

### **3.5) Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)**

As amostras de vitelo fixadas e centrifugadas foram colocadas em agar-agar 5% no Centro de Microscopia Eletrônica do ICBIM-UFU. O material foi recortado em cubos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup> e colocados em uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 por uma hora e depois tratadas com tetróxido de ósmio 1% contendo ferrocianeto de potássio (1,25%) por mais 30 minutos. Os fragmentos foram desidratados em

séries de concentração crescentes de acetona, incluídos em resina Epon e cortados em ultramicrótomo para obtenção de cortes ultrafinos (Bozzola and Russell, 1998).

Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e posteriormente, com citrato de chumbo (Bozzola and Russell, 1998). A avaliação e a documentação fotográfica foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss Eletron Microscope EM 109).

### **3.6. Viabilidade e patogenicidade de *C. jejuni* em embriões de aves SPF**

Foram utilizados 100 ovos “specific pathogen free” (SPF), sendo 50 pertencentes ao grupo teste e 50 ovos utilizados como controle. Os ovos do grupo teste foram artificialmente inoculados com 0,1 mL de uma solução de NaCl 0,85% contendo  $10^3$  UFC de *C. jejuni* IAL 2383. A inoculação foi realizada na câmara de ar, no pólo superior, sem rompimento da membrana corioalantoide, utilizando agulha hipodérmica estéril (0,3mmx13mm). Os ovos do grupo controle foram inoculados no mesmo local e com a mesma solução do grupo teste, porém sem a bactéria. Os ovos foram incubados em duas incubadoras experimentais (brood chocadeira Ltda) da mesma marca, modelo e ano de fabricação, destinadas a cada grupo (teste e controle), ajustadas e sincronizadas para temperatura, umidade e viragem, localizadas no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA – UFU).

Após 21 dias de incubação, os pintos eclodidos e não eclodidos foram enviados ao Laboratório de Biotecnologia animal (LABIO-UFU) e foram analisados quanto à viabilidade por ovoscopia. Foi retirado 1 mL do vitelo de cada uma das amostras e adicionado a 9mL de caldo Bolton (Oxoid) e analisado imediatamente para investigar a presença de *C. jejuni* por real-time PCR. Em paralelo, essas amostras foram pré-enriquecidas em atmosfera de microaerofilia (Probac microaerobac generator) a temperatura de 37°C por 24 horas para posterior cultivo em meio sólido CCDA (Oxoid). Os protocolos de cultura em placa, PCR multiplex e PCR em tempo foram os mesmos utilizados para análise da passagem da *C. jejuni* em ovos descritos nos itens 3.2, 3.3 e 3.4.

As amostras de vitelo foram fixadas em glutaraldeído 3% foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, o vitelo foi centrifugado e adicionado a agar-agar 5% para processamento em TEM conforme já descrito no item 3.5.

### 3.7. Alterações morfológicas de intestinos de embriões infectados por *C. jejuni*

A coleta das amostras foi realizada em embriões de aves SPF com 20 dias de incubação. Foram incubados 20 ovos a fim de se obter 10 embriões viáveis. Esses ovos foram incubados nas incubadoras localizadas em uma sala própria Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA – UFU). O processamento das amostras foi realizado no laboratório de histologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Com 20 dias de incubação, os embriões foram insensibilizados com cetamina 30mG/kG e anestesiados com xilasina 0,4mG/kG. Após, foram sacrificadas por deslocamento cervical e foi retirado o intestino das aves, separando-se a porção referente ao íleo, o qual foi acondicionado em DEMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril e enviado ao laboratório de histologia ICBIM-UFU. Antes da realização do trabalho, 5 embriões foram analisadas para confirmar a negatividade para *C. jejuni*.

Imediatamente após o sacrifício, foram coletados 40 fragmentos de íleo de aproximadamente 0,5 mm, divididos em dois grupos (tratado e controle) de 20 embriões. Os fragmentos foram incubados em placas de cultura celular de 24 poços contendo meio de cultura DEMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C, atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e máxima umidade. Após cinco minutos de incubação, a cada poço com fragmentos do grupo tratado foi adicionado 0,1mL de soro fisiológico (0,85% de Na Cl) contendo 10<sup>3</sup> UFC de *C. jejuni*. Aos poços contendo fragmentos do grupo controle foi adicionado 0,1mL de soro fisiológico puro. Após os tempos de 15 e 60 minutos metade dos fragmentos em cada tempo foi retirada e fixada com formol 4% até o processamento das amostras.

Após fixação, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente a 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%, clarificadas em Xilol (100%) e incluídos em parafina histológica. Cortes histológicos de 5 a 7 µm de espessura foram corados por hematoxilina-eosina e montados em bálsamo do Canadá.

Os fragmentos de íleo foram avaliados morfológicamente verificando a integridade das vilosidades comparando-se os grupo controle e tratado em cada momento de coleta. Todos os cortes histológicos foram avaliados por análise computacional de imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus BX 40 com uma objetiva de 100X, acoplada a uma câmera Olympus Oly 200 conectada a um microcomputador PC através da placa digitalizadora Datatranslation 3153. As análises morfométricas foram realizadas pelo software HL Image (Western Vision Software).

De cada fragmento foram medidas aproximadamente 225 células epiteliais de 12 diferentes vilosidades e de cada célula foi medido a altura e a largura.

### 3.8. Análise Estatística

Foi utilizada estatística descritiva aplicando-se valor relativo em forma de percentagem para positividade na PCR, na análise microbiológica de cultura em placa e número de embriões ou pintos viáveis. Para comparação entre os resultados obtidos na análise microbiológica convencional e na PCR foi realizado o coeficiente de kappa ( $p<0,05$ ). Para verificar a influência da presença da bactéria sobre a mortalidade embrionária foi utilizado o teste do quiquadrado ( $\chi^2$ ). Para verificar diferenças morfométricas entre os enterócitos de cada grupo foi utilizado o teste “t”

As análises das variáveis foram realizadas com o uso do programa estatístico Biostat 5.0 (AIRES, 2007).

## 4.0 Resultados

### 4.1. Passagem, colonização e viabilidade de *C. jejuni* em vitelos e embriões de ovos férteis

*Campylobacter jejuni* permaneceu viável e cultivável nas amostras de maravalha utilizadas para o grupo teste coletadas após 3 horas, 7 horas e 24 horas. A bactéria não foi detectada em nenhuma amostra de maravalha utilizada para o grupo controle em nenhum dos períodos analisados.

Após contato com a maravalha contaminada com *C. jejuni* durante 3 horas foi detectada a presença da bactéria em 20% (20/100) dos ovos SPF e 10% (10/100) dos ovos de matrizes. Os resultados foram coincidentes nas técnicas de real time PCR e cultivo em placas.

Passados 7 horas e 24 horas de contato com a maravalha contaminada, o microrganismo não foi detectado em nenhuma das amostras. Não houve positividade nos ovos SPF e de matrizes utilizados como controles em nenhum dos períodos analisados.

Nos embriões provenientes de ovos SPF inoculados na câmara de ar, a porcentagem de positividade para *Campylobacter jejuni* foi de 80% (40/50) após 21 dias de incubação. A bactéria não foi isolada em nenhum embrião dos ovos inoculados somente com NaCl 0,85% estéril.

Tabela 1 – Relação entre a presença de *C. jejuni* e a mortalidade de embriões provenientes de ovos SPF inoculados na câmara de ar com a bactéria (teste) e com NaCl 0,85% estéril (controle).

Embrião	Teste	Controle	p ( $\chi^2$ )
Vivo	0	26	<0.0001
Morto	46	21	<0.0001
Total*	46	47	

\* Ovos inférteis não entraram na análise (grupo teste=4; grupo controle=3)

Os embriões do grupo inoculado com *C. jejuni* IAL 2383 na câmara de ar apresentaram mortalidade precoce ( $p<0,05$ ), com 86,9% (40/46) dos embriões mortos aos dois dias de incubação (tabela 2).

Tabela 2. Classificação de embriões SPF oriundos de ovos inoculados na câmara de ar com *C. jejuni* IAL 2383 (teste) e com NaCl 0,85% estéril (controle).

	Grupo teste (n)	Grupo controle (n)
Infértil	4	3
Eclodidos	0	26
ME aos 2 dias	40	4
ME aos 3 dias	0	2
ME aos 4 dias	0	4
ME > 5 dias	6	11

ME: Mortalidade embrionária

A tabela 3 mostra a relação entre os resultados obtidos pelas técnicas de cultivo em placas e real-time PCR em amostras de vitelo de embriões ou pintos provenientes de ovos SPF inoculados com *C. jejuni* na câmara de ar utilizando o coeficiente kappa. Houve boa replicabilidade entre os resultados e em sete amostras houve positividade apenas com a utilização do real-time PCR.

Tabela 3. Teste Kappa comparando PCR em tempo real e cultura em placa em amostras de vitelo de embriões inoculados na camara de ar com *C. jejuni* (IAL 2383)

		Real-time PCR	
		P	N
		P	33
Plate culture	N	7	10
	K= 0,6535	p<0,0001	

*Replicability: Good*

As contagens de *C. jejuni* por grama de vitelo variaram de  $3,4 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> a  $5,9 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>, com média de  $9,54 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>  $\pm 1,32 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> (tabela 4).

Tabela 4. Contagem de *C. jejuni* (UFC.g<sup>-1</sup>) em vitelos de ovos inoculados na câmara de ar após 21 dias de incubação

	UFC.g <sup>-1</sup>
Mínimo	$3.4 \times 10^5$
Máximo	$5.9 \times 10^7$
Mediana	$3.6 \times 10^6$
Média Aritmética	$9.5 \times 10^6$
Desvio Padrão	$1.3 \times 10^7$

A MET demonstrou a presença da bactéria no vitelo de ovos de matrizes e SPF que permaneceram em contato com a maravalha e em vitelo de embriões provenientes dos ovos SPF inoculados (figuras 1 e 2). A bactéria não foi observada em amostras do grupo controle

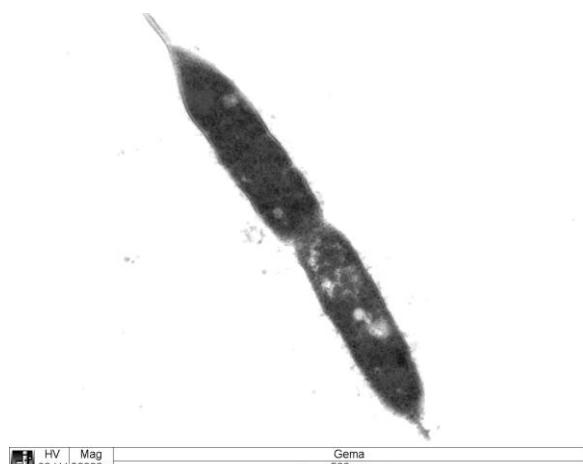


Figura 1: Fotomicrografia de *C. jejuni* no interior de vitelos de embriões infectados com mortalidade precoce

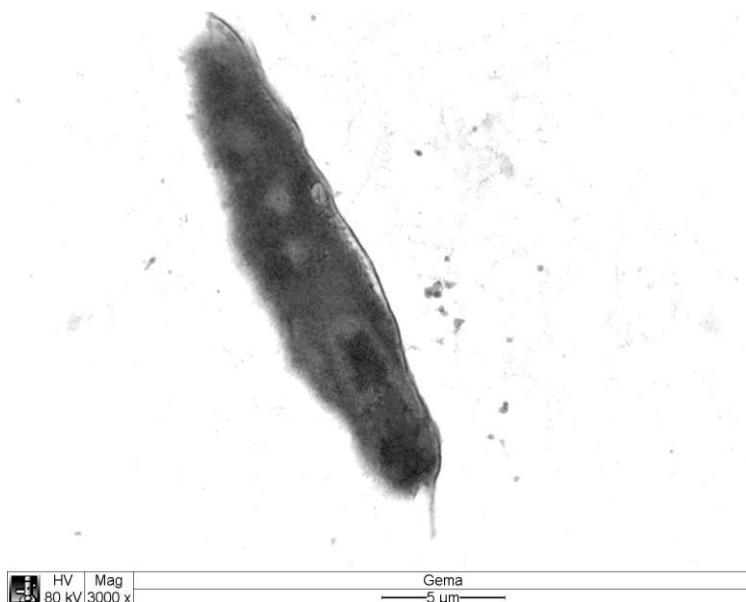


Figura 2: Fotomicrografia de *C. jejuni* no interior de vitelos de ovos de aves SPF e matrizes em contato com maravalha contaminada

Não foram observadas alterações histopatológicas evidentes nas condições testadas. No entanto, a avaliação morfométrica mostrou alterações significativas tanto na altura quanto na largura dos enterócitos de *explants* de intestino de embriões com 20 dias de idade. As células do grupo tratado ficaram maiores quando comparadas com as células do grupo controle (figuras 3 e 4).

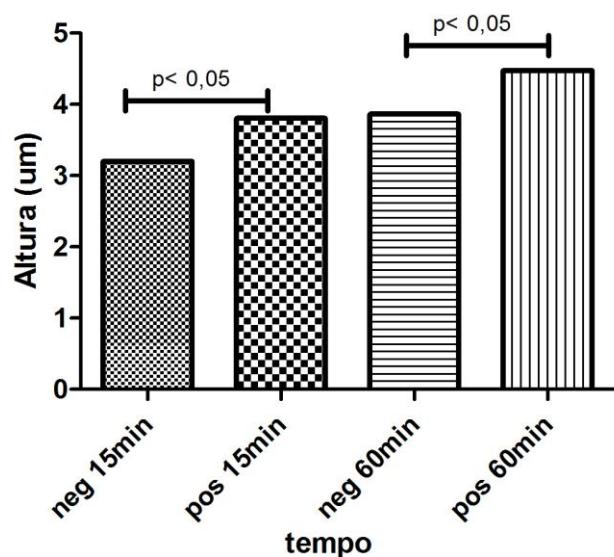


Figura 3. Morfometria (altura) de células epiteliais de *explants* intestinais de fíleo de embriões de aves SPF.

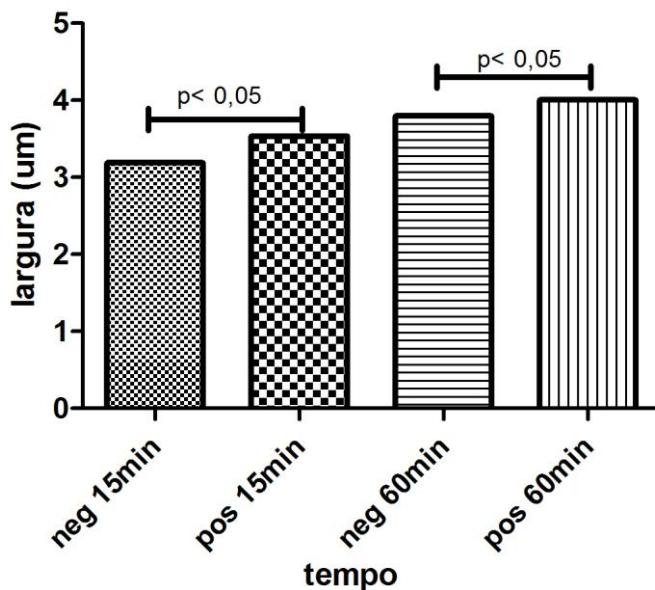


Figura 4. Morfometria (comprimento) de células epiteliais de *explants* intestinais de fíleo de embriões de aves SPF.

#### 4.0. Discussão

Os resultados mostram que houve passagem de *C. jejuni* presente na maravalha para o interior de ovos SPF e de matrizes com 3 horas de contato. Esse fato não deixa dúvidas de que essa bactéria tem capacidade atravessar os poros dos ovos, passar pelo albumen e permanecer viável. Assim, é possível especular que mesmo que ovos de matrizes possuam anticorpos maternos contra *C. jejuni* (SAHIN *et al.*, 2001) a passagem através dos poros da casca e a multiplicação da bactéria no interior é possível. Outros autores, Allen e Griffiths (2001) observaram que é possível a passagem da bactéria pela casca dos ovos utilizando luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC 3329 e relatam que 4% dos ovos podem ser experimentalmente infectados com *C. jejuni* após imersão em condições de microaerofilia.

A positividade de 80% de vitelos dos embriões de ovos SPF inoculados com *C. jejuni* na câmara aos 21 dias de incubação mostra que a bactéria é capaz de sobreviver e se multiplicar nas condições de microambiente de incubação. As contagens da bactéria variaram de  $3,4 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> a  $5,9 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> após o período de incubação, indicando que a bactéria foi capaz de se multiplicar no interior do ovo já que foi inoculado  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>.

Além de sobreviver e se multiplicar, a bactéria ocasionou danos suficientes para causar mortalidade nos embriões nos primeiros dias de incubação. Alguns relatos antigos evidenciam que *C. jejuni* é capaz de levar a mortalidade embrionária em aves (LAM *et al.*, 1992; KING *et al.*, 1993). Todas as mortalidades foram em fases precoces e isso pode ser explicado por Zhang e Sharma (2003) que afirma que mortalidade precoce de embriões a um patógeno é provavelmente devido à falta de imunidade ativa já que só com 14 dias de idade embrionária as aves adquirem a capacidade funcional de detectar a entrada de antígenos.

A viabilidade da bactéria que entrou pelos poros apenas no período de 3 horas após contato com maravalha infectada e a alta taxa de sobrevivência da *C. jejuni* em vitelos durante todo período de incubação pode ser explicada pela temperatura. A temperatura de incubação é de 37°C, o que é ideal para microorganismos termotolerantes. Já a temperatura de 25°C onde permaneceram os ovos em contato com a maravalha é baixa para a multiplicação da *C. jejuni*.

Neste estudo foi utilizada maravalha contaminada com a bactéria diluída em meio de cultura e 5% de sangue e esta é uma evidência que em circunstância práticas, se houver contato dos ovos com material infectado, é possível a passagem dessa bactéria para seu interior. Muitas vezes, na oviposição, os ovos aproveitados permanecem sujos com resíduos orgânicos como fezes e sangue. Além disso, em muitos locais de clima quente ainda não há um local de armazenamento adequado para esses ovos em temperaturas mais baixas.

É possível que a alta mortalidade embrionária observada nos embriões SPF não seja um problema nas práticas de avicultura industrial onde as aves reprodutoras têm contato prévio com a bactéria. Porém, a capacidade de penetrar nos poros dos ovos de matrizes após contato com material contaminado e manter a capacidade de se multiplicar mostra que a imunidade materna nem sempre é suficiente para conter a infecção. Caso a bactéria seja também capaz de penetrar naturalmente em ovos de matrizes ou ser transmitida via transovariana, mesmo que permaneça em formas não cultiváveis, e encontre temperaturas altas o suficiente para sua multiplicação, se converterá em um problema de saúde pública e em um desafio para a sanidade avícola.

Outro fator a ser considerado nos conjuntos desses resultados, é a especulação sobre as condições dos lotes de matrizes pesadas. Assim, pode ser que em determinados grupos de reprodutoras pesadas com baixa exposição ao antígeno ou com problemas de imunossupressão associado ao armazenamento dos ovos a temperaturas próximas a 37°C, a bactéria pode entrar pelos poros da casca e levar a mortalidade embrionária.

A análise dos *explants* de embriões, não evidenciou alterações histopatológicas evidentes à análise visual nas condições testadas. No entanto, a avaliação morfométrica mostrou alterações significativas tanto na largura quanto na altura dos enterócitos de *explants* de intestino de embriões com 20 dias de idade.

A relação entre o aumento celular e a infecção bacteriana é apresentada por vários autores em cultivo celular e a proteína responsável por essa alteração nessas células foi denominada toxina citoletal distensiva (CDT) (BAYLES, 2006; JEON; ITOH; RYU; 2005).

Uma vez dentro da célula, a proteína CdtB entra no núcleo e exibe uma atividade semelhante à DNase-I, resultando em cortes no DNA dupla fita. As células eucarióticas respondem aos cortes no DNA (SMITH; BAYLES, 2006), bloqueando a fase G2/M da divisão celular, induzindo uma distensão citoplasmática que leva à morte da célula (JEON; ITOH; RYU; 2005).

A alteração nas dimensões celulares de enterócitos de *explants* de íleo de embriões é um achado interessante mostrando que não só em linhagens celulares de mamíferos, mas provavelmente também em enterócitos de aves a bactéria libera secreções relacionadas a sua virulência.

## 5. Conclusão

Em condições experimentais a *C. jejuni* é capaz de penetrar pelos poros da casca de ovos, sobreviver e se multiplicar durante todo o período embrionário, levar a alta mortalidade precoce de embriões e alterar o tamanho dos enterócitos. É provável que em determinadas circunstâncias como alta temperatura de armazenamento dos ovos e em lotes com imunossupressão os achados experimentais desse trabalho possa se refletir nas condições de campo.

## Capítulo III

Quantificação de transcritos de citocinas e quimiocinas e alterações morfométricas e estruturais após invasão de *Campylobacter jejuni* em *explants* de íleo de aves SPF

## Resumo

Apesar da alta colonização de *C. jejuni* em aves, a sintomatologia clínica nesses animais ainda não foi determinada. Na expectativa de se obter melhor entendimento acerca da presença de *C. jejuni* em intestino de aves, o objetivo desse trabalho foi verificar a taxa de invasão, as alterações morfométricas e estruturais e a quantificação de transcritos de citocinas inflamatória em células de *explants* de íleo de aves SPF com 25 dias de idade. A bactéria invadiu os fragmentos intestinais, mas não houve indícios da multiplicação em seu interior. Enterócitos de células infectadas aumentaram suas dimensões quando comparados ao grupo não tratado. Houve aumento muito precoce de TGF- $\beta$ 3 provavelmente na tentativa de realizar uma imunomodulação antinflamatória. Porém a expressão de transcritos de TGF- $\beta$ 3 diminuiu a partir de 30 minutos de infecção e com 4 horas pós inoculação houve aumento de IL-1 $\beta$  que é uma potente citocina pro inflamatória. Não houve aumento de IL-8, CXCL-2 ou IL-6 nos períodos estudados. A partir dos resultados desse trabalho, pode-se hipotetizar que a *C. jejuni* leva a alterações na mucosa intestinal não se comportando meramente como um microorganismo comensal.

Palavras chaves: IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 3, distensão, invasão, frango, *Campylobacter jejuni*

## Abstract

Despite the high colonization of *C. jejuni* in poultry, the clinical symptoms in these animals has not been determined. Hoping to gain a better understanding about the presence of *C. jejuni* in the avian gut, the aim of this study was to determine the rate of invasion, morphological and structural changes and inflammatory cytokine expression in cells from *explants* of ileum of SPF birds with 25 days of age. *C. jejuni* invade the intestinal fragments, but there was no evidence of multiplication inside. Enterocytes of infected cells increased their size when compared to untreated animals. There was a very early increase of TGF- $\beta$ 3 probably in an attempt to achieve anti-inflammatory immunomodulation. But the expression of TGF- $\beta$ 3 decreased from 30 minutes of infection and 4 hours after inoculation there was an increase of IL-1 $\beta$  that is a potent pro inflammatory cytokine. There was no increase of IL-8, CXCL-2 or IL-6 in the periods studied. From the results of this work, it can be hypothesized that *C. jejuni* leads to changes in the intestinal mucosa does not behave merely as a commensal organism.

Keywords: IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 3, distension, invasion, chicken, *Campylobacter jejuni*

## 1. Introdução

As aves são incriminadas como a principal causa de Campylobacteriose humana pelo consumo da carne e subprodutos. Em aves, há alta ocorrência de *C. jejuni*, mas a alta colonização não resulta em sintomas clínicos (EVANS, 1997; JACOBS-REITSMA, 2000; MEAD, 2002). Mesmo sendo considerado um microorganismo comensal, alguns autores verificaram que a bactéria é capaz de se internalizar nos enterócitos de aves levando a produção de citocinas e recrutamento de heterófilos e linfócitos (LI et al., 2008; Smith et al., 2005). Ensaios conduzidos por Larson et al. (2008) *in vitro* mostrou que *C. jejuni* é capaz de estimular a migração de heterófilos em células de aves porém, *in vivo* sinais patológicos não foram observados (BAR-SHIRAH e FRIEDMAN, 2006).

Deun et al. (2008) também demonstraram a capacidade de *C. jejuni* invadir enterócitos de aves, porém para esses autores a bactéria entra e sai da célula sem levar a maiores danos driblando o sistema imune e se multiplicando no muco.

Algumas proteínas secretadas por *C. jejuni* tem um papel importante na virulência bacteriana. Uma toxina muito conhecida é Toxina Citoletal Distensora (CDT) que leva a uma distensão celular em linhagens de células epiteliais de mamíferos. Mesmo levando a alterações nas células e apesar da hipótese de que a toxina afetar a função da barreira epitelial levando a morte dos vilos (WHITEHOUSE et al., 1998), a associação entre indução dos sintomas gastrointestinais e a CDT ainda não é clara.

Apesar da constante presença de *C. jejuni* em lotes de aves, a maioria dos autores relatam que não há evidências clínicas associadas à colonização intestinal por essa bactéria. No entanto, há uma linha de pesquisadores que acredita que essa bactéria pode provocar sintomas clínicos nas aves mesmo que brandos. O entendimento das alterações provocadas por *C. jejuni* em intestino de aves é necessário, pois mesmo que de forma subclínica, a presença dessa bactéria pode levar efeitos indesejáveis em lotes de aves.

## 2. Objetivos

O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de invasão de *C. jejuni* em *explants* de íleo de aves SPF com 25 dias de idade, bem como as alterações histopatológicas e

morfométricas nos enterócitos destes *explants* e a quantificação de transcritos de citocinas inflamatórias nestes *explants*.

### **3. Material e métodos**

Fragmentos de íleo de 4 (quatro) aves SPF com 25 dias de idades criadas em uma empresa de produção comercial foram utilizados para verificar as alterações histopatológicas e morfométricas, quantificação de transcritos de genes de citocinas e o processo de internalização. Um total de quatro aves foram insensibilizados com cetamina 30mG/kG e anestesiados com xilasina 0,4mG/kG. Após, foram sacrificadas por deslocamento cervical, retirado o intestino das aves separando a porção referente ao íleo e acondicionado em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril e enviado ao laboratório de histologia ICBIM-UFU. Antes da realização do trabalho, fragmentos de íleo foram retirados em paralelo para confirmar a negatividade para *C.jejuni*.

Imediatamente após o sacrifício, os fragmentos de íleo de aproximadamente 0,5 mm foram coletados, sendo que de cada ave foram retiradas amostras para infecção com a bactéria e amostras para controle negativo. Os fragmentos foram incubados em placas de cultura celular de 24 poços contendo meio de cultura DEMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C, atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e máxima umidade. Após cinco minutos de incubação, a cada poço com fragmentos do grupo tratado foi adicionado 0,1mL de soro fisiológico (0,85% de Na Cl) contendo 2X10<sup>7</sup> UFC de *C. jejuni*. Aos poços contendo fragmentos do grupo controle foi adicionado 0,1mL de soro fisiológico puro. Após os tempos determinados nos itens seguintes para cada tipo de diagnóstico, foi retirado um fragmento para análise de internalização, alterações histopatológicas e morfométricas e quantificação dos transcritos de genes para produção de citocinas inflamatórias.

#### **3.1. Internalização de *C. jejuni* em explantes de aves SPF**

As amostras para ensaio de invasão foram coletadas nos tempos 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e foi utilizado o protocolo de Deun et al. (2008) modificado. Cada fragmento foi pesado para posterior diluição. A fim de retirar as bactérias aderidas, mas não internalizadas, os fragmentos foram lavados 5 X com solução de Hank`s (HBSS - Balanced Salt Solution) com cálcio e magnésio. Após, os fragmentos foram tratados com gentamicina 100 µg/ml

durante 2 horas para matar as bactérias aderidas. Os fragmentos foram novamente lavados 5 vezes com solução de HBSS com cálcio e magnésio sem centrifugação para retirada das bactérias não internalizadas. Os fragmentos foram novamente lavados 5X com solução de HANK`s centrifugados a 350xg force por 10minutos para retirada dos DNA das bactérias não internalizadas. As amostras foram submetidas ao tratamento com 2mL de 1% de tritom X 100 e trituradas durante 30 minutos para liberação das bactérias internalizadas. Cada amostra foi diluída na proporção de 1:10 e após, realizados ensaios de PCR em tempo real para contagem.

### **3.2. PCR em tempo real das amostras para quantificação de *C. jejuni* internalizada**

O real-time PCR foi realizado no BAX System de acordo as orientações do fabricante (USER GUIDE, 2007). No laboratório, imediatamente após a chegada, as amostras foram diluídas na concentração de 1:10 em caldo Bolton levando em conta o peso de cada fragmento de intestino pesando antes da trituração. Depois de homogeneizadas, alíquotas de 5µL foram transferidas para microtubos (Bioexpress, USA) contendo 200µL de solução de lise. A mistura foi aquecida a 37°C por 20 minutos e 95°C por 10 minutos, e depois transferida para bloco de resfriamento (2°C a 8°C) durante 5 minutos. Após resfriamento, 30µL do lisado foi transferido para os tubos de PCR contendo os primers para *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, dNTPs, a Taq-DNA polimerase, corante fluorescente, controle positivo interno e demais reagentes necessários para a PCR. Os tubos foram transferidos para o termociclador/detector, onde o programa pré-estabelecido no *hardware* do equipamento foi executado. Ao final do ciclo de amplificação e detecção, o equipamento automaticamente liberou os resultados identificando a espécie e o número de UFC.g<sup>-1</sup>. A cepa ATCC 33291 de *Campylobacter jejuni* foi processada em paralelo e utilizada também como controle positivo.

### **3.3. Alterações morfológicas e morfométricas de *explants* de aves SPF infectados com *C. jejuni***

Amostras dos *explants* infectados e não infectados foram coletadas nos tempos 15 e 60 minutos e após e fixadas em formol a 10%. Após a fixação, foram desidratadas em série alcoólica crescente a 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100% sendo trinta minutos em cada concentração, clarificadas em Xilol (100%) e incluídos em parafina histológica. Cortes histológicos de 5 a 7 µm de espessura foram corados por hematoxilina-eosina e montados em bálsamo do Canadá.

Os fragmentos de íleo foram avaliados morfologicamente verificando a integridade das vilosidades comparando-se os grupo controle e tratado em cada momento de coleta. Foi também realizada análise morfométrica dos enterócitos medindo a altura das células. De cada fragmento foram medidas aproximadamente 64 células epiteliais de 8 diferentes vilosidades.

Todos os cortes histológicos foram analisados através de cruzamento de imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus BX 40 com uma objetiva de 100X, acoplada a uma câmera Olympus Oly 200 conectado a um microcomputador PC através de um cartão de Tradução 3153 dados. As análises morfométricas foram realizadas pelo software HL Image (Western Vision Software).

### **3.4. Quantificação de transcritos de citocinas e quimiocinas por RT-qPCR**

Os fragmentos foram coletados nos tempos de 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e conservados em ultrafreezer (-80°C) até o processamento. Para avaliação da quantificação dos transcritos das citocinas IL1 $\beta$ , IL 8, IL6, TGF e CXCL-2 foi utilizado RT-PCR quantitativa em tempo (reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase RT-PCR). Antes, das reações, os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados e cada *primer* foi padronizado.

#### **3.4.1. Oligonucleotídeos específicos**

Foram desenhados pares de oligonucleotídeos iniciadores para cada uma das sequências gênicas das citocinas das espécie *Gallus gallus* (IL $\beta$ , IL6, IL8, TGF, CXCL-2) e para o gene endógeno de referencia da galinha (beta actina), para se estabelecer o perfil transcripcional em amostras de células e explantes de frango. Na tabela 1 estão descritos os oligonucleotídeos considerados viáveis quanto aos padrões de amplificação segundo o programa *Primer Express* versão 3.0.

Os oligonucleotídeos foram inicialmente testados em PCR convencional para a confirmação do fragmento amplificado e da ausência de *amplicons* inespecíficos. Para padronização foi utilizada fitohemaglutinina a 1mG/mL (KATIAL et al., 1998) em cultura de *explant* durante 3 horas. As reações de PCR convencional para a amplificação dos oligonucleotídeos anteriormente descritos foram realizadas para um volume final de 20 ul contendo: 1uL de cDNA, 1U of Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 M dNTPs e 5.0 pmoles de *primers* direto e

reverso. As condições das reações foram: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 40 s, 59°C por 50 s, 72°C por 50 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min.

Os *amplicons* foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5 %, por 1 hora a 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X, corado com 0,5 µg/ml de syber safe (Invitrogen Brasil Ltda), visualizado por luz UV em um transluminador (L.PIX Loccus biotecnologia).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados e padronizados para quantificação de citocinas em aves.

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	T°C de anelamento
IL1β <i>G. gallus</i>	IL1β foward	TGAGCCCGTCACCTCCA	141	58°C
	IL1β reverse	GCGCAATGTTGAGCCTCACTT		
CXCL-1 <i>G. gallus</i>	CXCL-1 foward	TGAACCTCCGATGCCAGTGC	141	54°C
	CXCL-1 reverse	GCTCAGGGAGGATTTCGCAA		
IL8 <i>G. gallus</i>	IL-8 foward	GCACTTATGGCCAAGGCTCA	149	58°C
	IL-8 reverse	CGATGTGGAAGGTGGAAGATG		
IL-6 <i>G. gallus</i>	IL-6 foward	CTGTCGCCTTCAGACCTACC	120	58°C
	IL-6 reverse	CACCATCTGCCGGATCGT		
TGFβ-3 <i>G. gallus</i>	TGFβ-3 foward	TGAGTGGCTTCTGCACAGAGAG	50	60°C
	TGFβ-3 reverse	GTATGCTGATTCCAGGCCG		
Beta actina <i>G. gallus</i>	Beta actina foward	CCACCGCAAATGCTTCTAAC	102	
	Beta actina reverse	TAATCCTGAGTCAAGCGCCA		

### 3.4.2. Extração RNA total das células e tecidos

A extração do RNA total das amostras de tecido e células foi realizada utilizando-se o Trizol Reagent® (INVITROGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, os tecidos foram macerados em 1mL de trizol. As amostras foram adicionadas a 0,2mL de clorofórmio e centrifugada a 20.500xg a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida

para um microtubo e adicionada a 0,5mL de isopropanol, homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 10minutos para ser centrifugada a 20.500xg por 10minutos a 4<sup>0</sup>C. O pellet foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 7.500xg a 4<sup>0</sup>C e após secado e ressuspensionado em água DEPC para posterior quantificação por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm.

A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose e por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,5 %, por uma hora a 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE 0,5 X, corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação *ImageSystem* – VDS, Amersham Biosciences). Em seguida, o ácido ribonucléico foi armazenado à -80<sup>0</sup>C para subsequentes análises.

#### **3.4.3. Transcrição reversa**

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 1 µg de RNA total (200ng/uL), 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20 µl com água tratada com DEPC. A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37oC por 1 hora. Reações controle foram realizadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20<sup>0</sup>C para posterior amplificação.

#### **3.4.4. PCR para validação das amostras**

A qualidade do cDNA foi avaliada pela amplificação de um fragmento de 139 pb do gene constitutivo beta actina (tabela 1). As condições desta reação foram: 1X tampão de PCR (20 mM Tris-HCl – pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v) (Invitrogen), 200 mM de dNTPs (Invitrogen), 5 pmoles de *primers* (Invitrogen), 1 U *Platinum®Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 3 µL de cDNA e água mili-Q utilizada para completar o volume final da reação para 20 µL. A reação ocorreu com um ciclo inicial de 95<sup>0</sup>C por 4 min, 35 ciclos de 94<sup>0</sup>C por 40 s, 59<sup>0</sup>C por 40s, 72<sup>0</sup>C por 50s e um ciclo final de 72<sup>0</sup>C por 5 min em termo ciclador PTC-100 (MJ Research Inc.). O produto da reação

foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado com 0,5 mg/mL de syber safe (invitrogen).

### 3.4.6. Quantificação de mRNA por PCR em tempo real

As quantificações relativas dos genes alvos para cada espécie (tabela 1) em relação ao gene de referência beta actina foram realizadas por PCR em tempo real a partir do cDNA transcrita reversamente de 1 $\mu$ g de RNA total extraído de cada amostra. As reações de PCR em tempo real para a amplificação dos oligonucleotídeos anteriormente descritos foram realizadas para um volume final de 10  $\mu$ l contendo: 2  $\mu$ l de cDNA, 5 $\mu$ l *Master Mix SYBR®Green PCR Core Reagents* ((Applied Biosystems) composto por: AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD, dNTPs com dUTP/dTTP), 5 pmoles de *primers* direto e reverso. As temperaturas de anelamento estão descritas na tabela 1.

Durante a amplificação, o número mínimo de ciclos para amplificação (*threshold*) relacionando os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo foi construído pelo sistema de análise *software*. Este valor, denominado Ct (“Cycle Threshold”) permitiu a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras. O Ct dos genes alvo foi normalizado pelos Ct dos genes controle de referencia (endógenos).

O Ct é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene-alvo em uma determinada amostra, quanto menor for o número inicial do Ct obtido do gene-alvo existente na amostra, comparativamente com outra amostra, é porque houve maior amplificação do gene-alvo e, consequentemente, o mesmo apresenta maior expressão.

Para obter a quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes em estudo (fold change), o grupo tratado foi comparado ao grupo controle pela metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001). Assim, o Ct foi normalizado com a expressão do endógeno através da fórmula dCt. A subtração do valor de dCt do grupo controle e do grupo infectado forneceu o valor de ddCt e a partir daí foi encontrado o valor de *fold change* pela derivação da fórmula  $2^{-ddCt}$ . Para os resultados negativos de ddCt foi aplicada a fórmula  $-(2^{(ABS(ddCt))})$  e para os resultados positivos de ddCt a fórmula  $2^{ddCt}$  foi utilizada de acordo com o esquema simplificado abaixo.

Passos para se obter a quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes em estudo no grupo infectado em relação ao grupo controle (*fold change*):

1. Normalização (dCt):

$$dCt = Ct_f - Ct_\epsilon$$

2. Calibração (ddCt)

$$ddCt = dCt_{cn} - dCt_i$$

3. *Fold change*

$$\text{Se } ddCt < 0: -(2^{(\text{ABS}(ddCt))})$$

$$\text{Se } ddCt > 0: 2^{ddCt}$$

$\epsilon$ : gene de referencia (endógeno)

$f$ : gene alvo

$cn$ : controle negativo

$i$ : grupo infectado

### 3.5. Análise estatística

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Sminorv para verificar se os dados eram paramétricos. Obedecida a distribuição normal, foi utilizado o teste de Turkey para verificar a diferença entre o valor de dCt entre os grupos infectados e controle. Os gráficos foram construídos com base no valor *fold change* que mostra quantas vezes o grupo infectado expressa o gene alvo em relação ao grupo controle.

As análises das variáveis foram realizadas com o uso do programa estatístico Graphpad Prism 5.

### 3.6. Aprovação do Comitê de ética

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, número 057/09 e número 323/09.

#### 4. Resultados

A contagem de bactérias internalizadas por grama de fragmento intestinal mostra que com o tempo de 15 minutos de infecção as bactérias já invadiram os *explants* e a contagem em logUFC/g não altera até o período de 4 horas (figura 1)

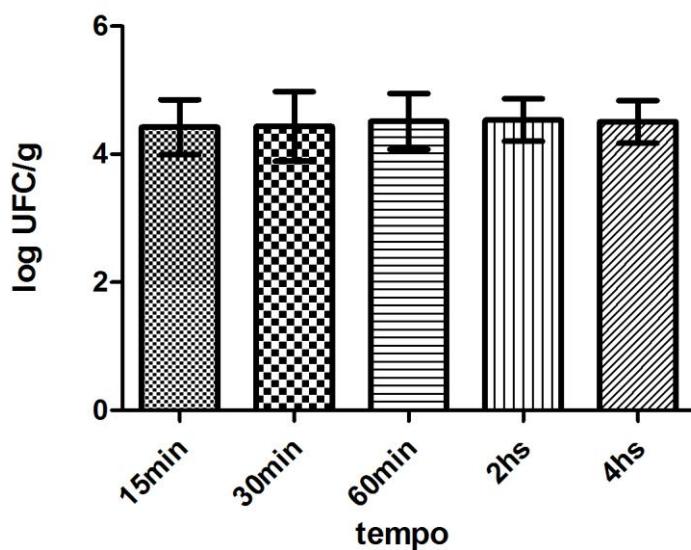


Figura 1. Quantificação de *C. jejuni* internalizada em *explants* de íleo de aves SPF com 25 dias de idade infectadas nos tempos investigados.

Não houve alterações histopatológicas perceptíveis à avaliação visual na mucosa intestinal dos *explants* infectados. Porém, alterações morfométricas foram identificadas na altura das células epiteliais (figura 2).

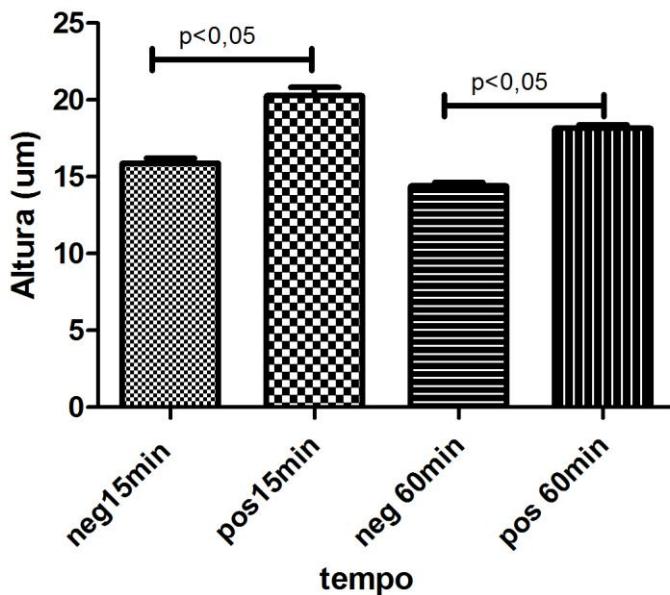


Figura 2. Média da altura de enterócitos infectados com *C. jejuni* e não infectados.

Para teste da quimiocina CXCL-2 não foi identificada diferença estatística para dCt entre os grupos controle e teste nos tempos (tabela 2). A figura 3 apresenta os valores de *fold change* para o nível de expressão do grupo tratado em relação ao grupo controle. Apesar do pico de *fold change* no tempo de 4 horas, esse valor não apresentou diferença significante.

Tabela 2. Valor de dCt para quimiocina CXCL-2 para os grupos desafiados com *C. jejuni* e os grupos controles em *explants* de íleo de aves SPF com 25 dias de idade.

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	4,63 <sup>aA</sup>	5,66 <sup>aA</sup>	6,14 <sup>aA</sup>	5,30 <sup>aA</sup>	4,37 <sup>aA</sup>
Teste	4,09 <sup>aA</sup>	9,22 <sup>aA</sup>	6,01 <sup>aA</sup>	5,00 <sup>aA</sup>	3,32 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

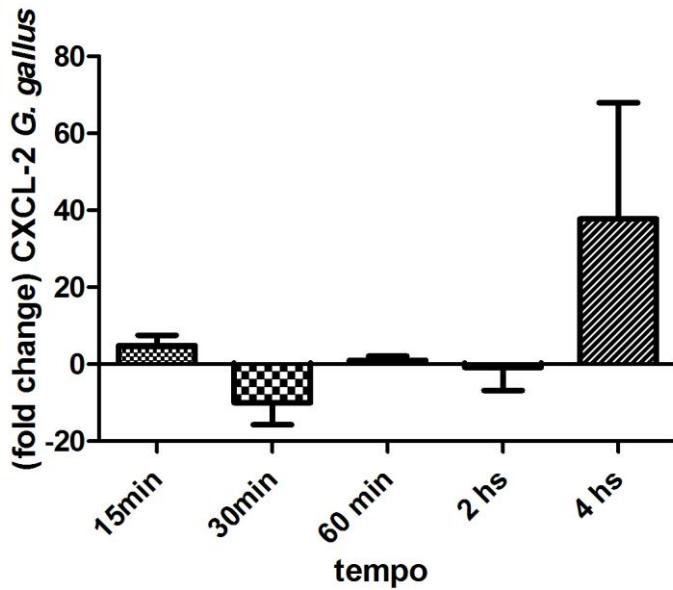


Figura 3. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de CXCL-2 dos grupos desafiados com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (*fold change*).

A análise de IL-8 mostra que tanto o grupo controle como o grupo teste apresentam uma diminuição nos valores de dCt com a cinética de tempo desse estudo. Porém, a presença da bactéria não altera o dCt em nenhum dos tempos testados (tabela 3). Os valores de *fold change* (figura 4) também aumentam com tempo com um pico no tempo 4 horas, apesar de não haver diferenças estatísticas nos valores de dCt até o período testado.

Tabela 3. Valor de dCt para quantificação de transcritos da citocina IL-8 para os grupos desafiados com *C. jejuni* e o grupo controle em *explants* de íleo aves SPF com 25 dias de idade.

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	11,62 <sup>a</sup>	12,17 <sup>a</sup>	11,52 <sup>a</sup>	10,18 <sup>b</sup>	6,94 <sup>c</sup>
Teste	11,48 <sup>aA</sup>	11,96 <sup>aA</sup>	11,30 <sup>aA</sup>	9,53 <sup>bB</sup>	6,26 <sup>C</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

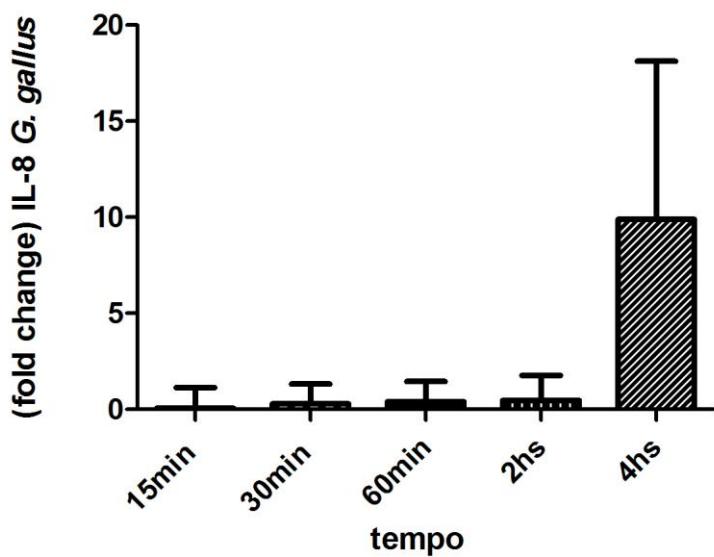


Figura 4. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de IL-8 dos grupos desafiados com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (*fold change*).

O valor de dCt para IL1 $\beta$  não apresenta variações com o tempo em cultura porém, no tempo 4 horas há diferença entre os grupo desafiado e controle (tabela 4). Na figura 5 está esquematizado o valor de *fold change* mostrando que no tempo de 4 horas há uma expressão de transcritos 38 vezes maior de IL-1 $\beta$  comparado grupo controle.

Tabela 4. Valor de dCt para transcritos da citocina IL1 $\beta$  para os grupos desafiados com *C. jejuni* e os grupos controles em explantes de íleo de aves SPF com 25 dias de idade

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	14,29 <sup>aA</sup>	16,20 <sup>aA</sup>	14,78 <sup>aA</sup>	13,81 <sup>aA</sup>	14,74 <sup>aA</sup>
Teste	12,66 <sup>a</sup>	15,05 <sup>a</sup>	13,75 <sup>a</sup>	12,33 <sup>a</sup>	10,66 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

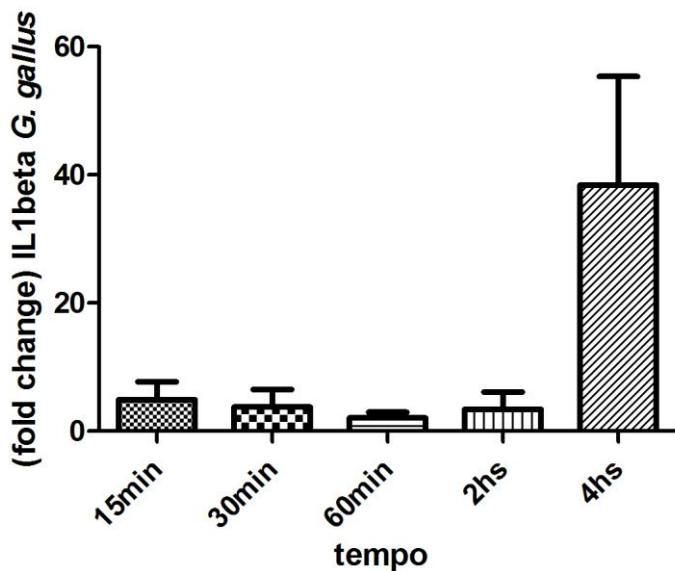


Figura 5. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de IL1 $\beta$  dos grupos desafiados com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (*fold change*).

Não houve diferença entre os grupos teste e controle para os valores de dCt para a citocina IL-6 em explantes de íleo de galinhas SPF (tabela 5). Os valores de *fold change* estão representados na figura 6.

Tabela 5. Valor de dCt para transcritos da citocina IL-6 para os grupos desafiados com *C. jejuni* e os grupos controles em *explants* de íleo de aves SPF com 25 dias de idade

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	7,30 <sup>aA</sup>	7,16 <sup>aA</sup>	7,84 <sup>aA</sup>	5,61 <sup>aA</sup>	4,72 <sup>aA</sup>
Teste	5,80 <sup>aA</sup>	10,54 <sup>aA</sup>	8,49 <sup>aA</sup>	8,20 <sup>aA</sup>	3,19 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

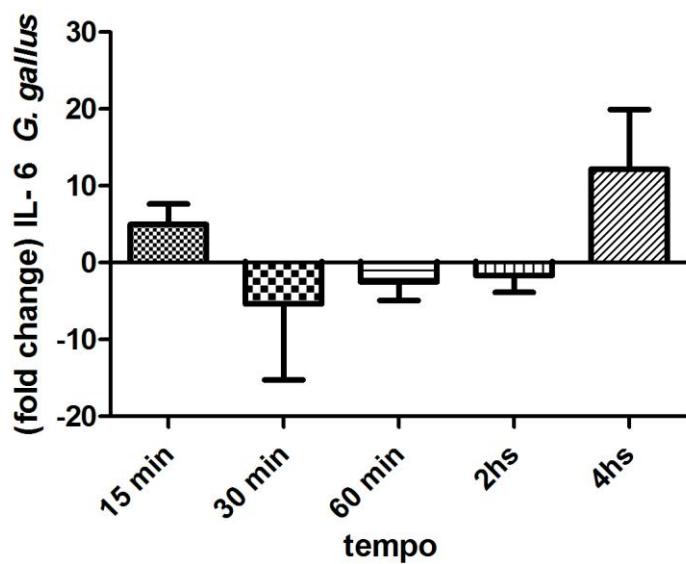


Figura 6. Quantificação relativa dos níveis de expressão de IL-6 dos grupos desafiados com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (fold change).

Houve diferença entre os grupos teste e controle para os valores de dCt para a citocina TGF $\beta$ -3 em explantes de íleo de galinhas SPF no tempo de 15 minutos (tabela 6) mostrando que há uma maior expressão dessa citocina no período de 15 minutos no grupo tratado (figura 7) em relação ao grupo controle. O valor para dCt aumentou tanto no grupo teste quanto no grupo controle depois de 15 minutos (tabela 6).

Tabela 6. Valor de dCt para expressão da citocina TGF- $\beta$ 3 para os grupos desafiados com *C. jejuni* e os grupos controles em *explants* de íleo de aves SPF com 25 dias de idade.

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	10,34 <sup>aA</sup>	11,34 <sup>bA</sup>	12,38 <sup>bA</sup>	11,49 <sup>bA</sup>	12,00 <sup>bA</sup>
Teste	7,58 <sup>aB</sup>	11,35 <sup>bA</sup>	10,6 <sup>bA</sup>	10,56 <sup>bA</sup>	11,24 <sup>bA</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

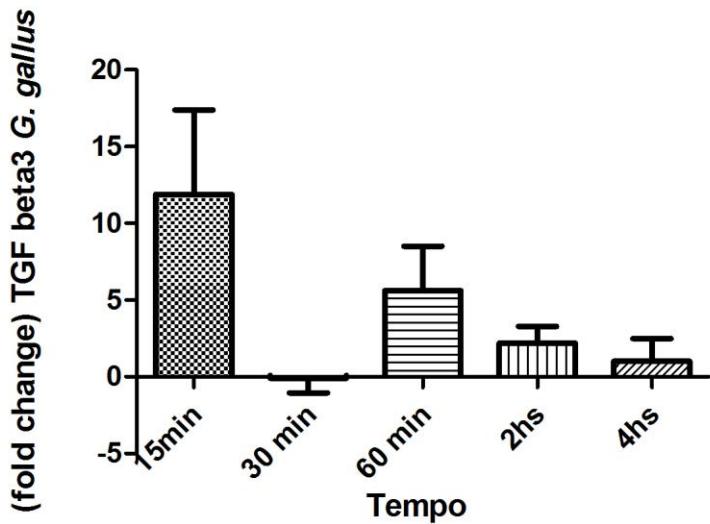


Figura 7. Quantificação relativa dos níveis de expressão de TGF- $\beta$ 3 dos grupos desafiados com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (*fold change*).

#### 4. Discussão

*Campylobacter jejuni* foi capaz de invadir as os *explants* de íleo de aves SPF o que corrobora com achados de outros autores (DEUN et al., 2008; LI et al., 2008). Isso indica que a persistência da bactéria nos lotes pode não ser devida apenas a simples colonização pelo processo de aderência ou multiplicação no muco. No período de 15 minutos até 4 horas não foram encontradas alterações significantes da quantidade de bactéria internalizada. Isso evidencia que a bactéria foi capaz de internalizar, mas que aparentemente as células intestinais não são o melhor ambiente para multiplicação desse agente até o período de 4 horas.

Nesse trabalho utilizamos o PCR em tempo real que quantifica o DNA genômico e automaticamente libera os resultados em UFC. Assim, a evidencia de que a bactéria seja capaz de invadir as células intestinais de íleo de aves foi comprovada nesse trabalho, porém a viabilidade do microorganismo após a entrada não pode ser confirmada.

O mecanismo de invasão e sobrevivência da bactéria no interior das células de aves ainda é pouco entendido, mas Deun et al. (2008) e Li et al. (2008) verificaram que cultura celular a quantidade de *C. jejuni* diminui com o tempo o que é diferente do que ocorre com *Salmonella Enteritidis*. Além disso, a bactéria é capaz de invadir, evadir e re-invadir as células

sem causar necrose, apoptose, lise celular e nenhuma inflamação na parede intestinal (DEUN et al., 2008). Para esses autores, esse mecanismo é importante para que *C. jejuni* utilize invasão e evasão temporária nas criptas das células e persistência pela rápida multiplicação no muco do intestino das aves.

O resultado para avaliação morfométrica mostrou alterações significativas na altura dos enterócitos de *explants* de intestino de aves SPF com 25 dias de idade. A principal proteína relacionada com essa alteração é a CDT que em células de mamíferos, devido a sua atividade semelhante a DNse-I, leva um bloqueio na fase G2/M da divisão celular induzindo a distensão citoplasmática levando a morte das células (JEON; ITOH; RYU; 2005).

Apesar de outros autores hipotetizarem alterações morfométricas em células epiteliais de aves infectadas por *Campylobacter jejuni* (NEWELL e WAGENAAR, 2000), essa alteração é pouco relatada. Nesse trabalho não foi avaliada as alterações morfométricas provocadas em enterócitos em animais *in vivo*. Assim, não é possível afirmar se essas alterações resultem ou não a doença clínica mesmo que de forma branda. Admitindo que não haja doença clínica, conforme descrito por grande parte da literatura, o mecanismo pelo qual a presença da bactéria seja capaz de alterar o tamanho das células epiteliais das aves e não levar a doença também não foi bem esclarecido nesse trabalho. Pode-se, no entanto especular que a proteína bacteriana provoque uma alteração celular, mas que a resposta imune a essas toxinas seja rápida o suficiente a ponto de não levar a apoptose. Outra hipótese, é que apesar da apoptose provocada pela toxina bacteriana, a rápida atuação do sistema imune associado a um alto *turn over* das células seja o suficiente para não resultar a doença.

Outro fator a ser considerado, é que no animal *in vivo* a sintomatologia em decorrência da distensão celular encontrada nesse trabalho, pode não acontecer com freqüência devido à resposta imune que não permite sequer a entrada da bactéria nas células. Entretanto, hipótese não é considerada pela equipe executora desse trabalho, já que em ensaios prévios utilizando aves reprodutoras adultas (não SPF) de campo foi identificada *C. jejuni* internalizadas (dados não mostrados). Para diminuir os efeitos da interferência de outros patógenos ou a presença da *C. jejuni* de campo, o experimento foi conduzido em aves SPF que apesar de serem adultas, podem não apresentar anticorpos para essa bactéria devido suas condições de criação. (CAWTHRAW et al., 1994; JEURISSEN et al., 1998).

Não houve aumento do nível de transcrito de IL-6, CXCL-2 e IL-8 em *explants* infectados com *C. jejuni* em relação ao controle negativo em nenhum dos tempos testados.

Smith et al. (2005) e Li et al. (2008) verificaram a maior expressão de citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 em células de aves infectadas com *C. jejuni*. Li et al. (2008) evidenciou o aumento de IL-1 $\beta$  e IL-6 após 4 horas de infecção com uma cepa de *C. jejuni* isolada de humanos em células primárias de intestino de embriões, enquanto Smith et al. (2005) relata um maior aumento de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 com 4 horas após a infecção. A diferença entre os achados desses autores e no presente trabalho pode estar relacionada à natureza do material em estudo. Isso porque, em fragmentos intestinais há presença de uma maior diversidade de células que podem liberar outras citocinas importantes para realizar uma resposta imunorregulatória, ao contrário do que ocorre em cultura de um único tipo celular, como nos trabalhos citados.

Houve um pico de transcrito de IL-1 $\beta$  no período de 4 horas e um pico de expressão precoce de TGF- $\beta$ 3 com 15 minutos após a infecção. Em aves, IL-1 $\beta$  e IL-8 tem papel inflamatório muito importante (WEINING et al. 1998; SCHNEIDER et al., 2000). Como o maior nível de transcrito de IL-1 $\beta$  ocorreu apenas 4 horas após o contato com a bactéria, é possível que as demais citocinas aumentem seus transcritos em tempos tardios. Nesse trabalho não foi possível avaliar essa especulação, pois a partir de 4 horas em cultura, os *explants* começam a entrar em um processo de desagregação que impede avaliações posteriores.

O maior nível de transcritos da citocina pro-inflamatória IL1 $\beta$  no tempo de 4 horas pode desencadear uma resposta inflamatória que não é normalmente relatada para microorganismos comensais. IL-1 $\beta$  está envolvida como o início da resposta inflamatória e há uma correlação entre o nível de IL-1 $\beta$  e a inflamação intestinal (REINECKER et al., 1991). Bactérias patogênicas como, por exemplo, *S. Typhimurium* aumenta显著mente os níveis de transcritos de citocinas pro inflamatórias como IL-1 $\beta$  em células do ceco de aves e esse aumento é persistente (BRISBIN et al., 2011; , BERNDT et al., 2007).

Apesar do papel pro inflamatório de IL-1 $\beta$  um trabalho recente de Brisbin et al. (2011) mostra que bactérias comensais como espécies de *Lactobacillus* também levam a um aumento dos níveis de transcritos de IL-1 $\beta$ , porém com um pico em períodos de 6 horas e essa expressão cai muito com o tempo até 18 horas pós inoculação em tonsilas cecais. Esse mecanismo, entretanto ainda não foi bem elucidado. Como *C. jejuni* é considerado um comensal em aves, estudos utilizando como referência bactérias intestinais como *Lactobacillus*, seriam úteis para melhor esclarecimento.

A citocina TGF- $\beta$ 3 apresentou altos níveis de transcritos apenas no período inicial após infecção com um decréscimo após o período de 15 minutos. Os membros da de TGF- $\beta$

tem um papel essencial na regulação da resposta imune. No entanto, essa família é conhecida pelo seu papel multifuncional e atua em uma grande variedade de tipos celulares (ROBERTS e SPORN, 1990). Na presença de microorganismos comensais como *L. salivarius*, há um aumento do nível de transcritos de TGF- $\beta$  durante períodos precoces e tardios após cultura em Ceco de aves e mamíferos (SHEIL et al, 2004; BRISBIN et al., 2011).

O pico do nível de transcritos de TGF- $\beta$ 3 precoce pode ser uma tentativa de regular a expressão de citocinas pro inflamatórias. Mas provavelmente, a interferência de outras citocinas não são capazes de permitir aumento dos transcritos por períodos superiores à 15 minutos. Interessantemente, os efeitos da cultura no grupo controle diminuem os transcritos dessa citocina e é razoável acreditar que isso ocorre já que o intestino perde sua homeostasia em que segundo Sanches-Munos et al. (2008) é uma função importante da TGF.

O conjunto de resultados descritos nesse trabalho é suficiente para se acreditar que *C. jejuni* parece não ser apenas um comensal em aves. É difícil estudar a bactéria nesses animais, principalmente *in vivo* devido a inúmeros fatores envolvidos como temperatura de criação das aves, idade, níveis de anticorpos, dose do microorganismo a ser utilizada e interferência de outros patógenos ou mesmo *C. jejuni* do próprio ambiente

Uma hipótese especulada nesse trabalho é que a *C. jejuni* cause sintomas brandos ou subclínicos e tais sintomas são ocultados por outras doenças mais graves e passam despercebidos levando apenas a prováveis perdas zootécnicas. Outra hipótese é que em aves a bactéria se comporte de forma semelhante a humanos de países desenvolvidos em que há altos níveis de anticorpos e a sintomatologia clínica não está presente (BLASER, 1987). Ainda, outro fator a ser especulado está relacionado a tolerância imunológica. Assim, é possível que o trato intestinal das aves tenha desenvolvido uma tolerância imunológica a *C. jejuni* assim como ocorre para outras bactérias intestinais (LEE e MAZMANIAN, 2010; JARCHUM e PAMER, 2011)

## 5. Conclusão

*Campylobacter jejuni* invade células de *explant* de íleo de aves em momentos precoces e leva a alterações nas dimensões das células epiteliais. Durante essa interação, há aumento dos transcritos de citocina pro inflamatória IL-1 $\beta$  após 4 horas de infecção. Enquanto a citocina TGF- $\beta$ 3 tem um pico de transrito muito precocemente (15min) diminuindo seus níveis a partir de 30 minutos. Outras importantes citocinas e quimiocinas pro inflamatórias como IL-8, IL-6 e CXCL-1 não variaram os níveis de transcritos na presença da bactéria. Os

resultados desse trabalho mostra que mesmo sendo considerada um microorganismo comensal *C. jejuni* é capaz de alterar o tamanho dos enterócitos. Assim, outros estudos devem ser realizados para melhor entendimento da relação patógeno e célula hospedeira de aves.

## Capítulo IV

Participação do citoesqueleto e  
compartimentos lisossomais nos mecanismos  
de invasão de *Campylobacter jejuni* em células  
Caco-2 e resposta celular pela análise  
morfométrica e da quantificação de transcritos  
de citocinas e quimiocinas

## Resumo

O mecanismo e a rota de invasão/evasão de *C. jejuni* em células epiteliais e a resposta das células pela quantificação de transcritos de citocinas inflamatórias ainda é um processo não completamente elucidado. Esse trabalho objetivou avaliar a participação dos microtubulos e microfilamentos de actina no processo de internalização, a interação dos lisossomos com fagossomos bacterianos, a alteração morfométrica e a quantificação de transcritos de citocinas inflamatórias em células Caco-2 infectadas com *C. jejuni*. Tanto actina como tubulina participaram do processo de internalização. E depois de internalizadas, os lisossomos se fundem aos fagossomos, o que provavelmente leva a morte bacteriana já que em períodos superiores a 2 horas de infecção a bactéria não foi visualizada por MET. Há aumento da expressão de transcritos de TGF-β3 em períodos precoces e de IL-8 a partir de 60 minutos pós infecção. Esse trabalho evidenciou que *C. jejuni* invade e provoca importantes alterações morfométricas em células epiteliais. Em resposta, as células aumentam a expressão de transcritos de citocinas que podem culminar com o processo inflamatório. O mecanismo de invasão são actina e tubulina dependentes e uma vez as bactérias interiorizadas, os lisossomos se fundem com os fagossomos.

Palavras chaves: IL-8, TGF-β3, lisossomos, citoesqueleto, invasão, Caco-2, *Campylobacter jejuni*

## Abstract

The mechanism and route of invasion/evasion from *C. jejuni* in epithelia cells and responses by the expression of inflammatory cytokines is a process not yet fully understood. This study aimed to evaluate the participation of actin and tubulin in the process of internalization, the interaction of bacterial phagosomes with lysosomes, the morphometric changes and the expression of inflammatory cytokines in Caco-2 cells infected with *C. jejuni*. Both actin and tubulin participated in the process of internalization. Inside cells, lysosomes fuse with phagosomes, which probably leads to bacterial death because in periods longer than two hours the bacteria was not seen by TEM. There is increased expression of TGF- $\beta$ 3 during the early stages and IL-8 from 60minutos post infection. This work showed that *C. jejuni* invades and causes major morphometric changes in epithelial cells. In response, the cells increase expression of cytokines that can lead to inflammation. The mechanism of invasion are dependent on actin and tubulin and once internalized, lysosomes fuse with phagosomes.

Keywords: IL-8, TGF- $\beta$ 3, lysosomes, cytoskeleton, invasion, Caco-2, *Campylobacter jejuni*

## 1. Introdução

Nos últimos anos muitos avanços têm sido realizados no estudo da interação de *Campylobacter jejuni* com a célula hospedeira. No entanto, mesmo se conhecendo os efeitos da bactéria no intestino humano e o número de estudos sobre esse agente, ainda não há uma completa elucidação acerca dos mecanismos de invasão utilizados pelos microorganismos e a resposta celular a tais mecanismos.

A participação do citoesqueleto no processo de invasão ainda é muito discutida. Para alguns é actina dependente (MONTEVILLE *et al.*, 2003; BISWAS *et al.*, 2003) e para outros microtubulo dependente (OELSCHLAEGER *et al.*, 1993; HU and KOPECKO, 1999). Outro processo ainda não completamente entendido é a sobrevivência da bactéria no interior das células epiteliais. Trabalhos acerca da rota intracelular da *C. jejuni* em células epiteliais são muito divergentes.

A possibilidade de que a bactéria consiga evadir células epiteliais ou células do sistema imune ainda não foi bem determinada. Outro ponto ainda não completamente elucidado é a estratégia de sobrevivência intracelular utilizada por essa bactéria. Enquanto Konkel *et al.* (1992) afirma que a *C. jejuni* é capaz de se multiplicar em vacúolos de células epiteliais, De Melo *et al.* (1989) relata que a bactéria pode ser digerida após fusão do fagossomo com o lisossomo.

A resposta das células epiteliais na presença da *C. jejuni* é caracterizada pela indução de citocinas como IL-8 que é uma potente pró-inflamatória (WATSON e GALAN, 2005). A indução de IL-6 também tem sido descrita como importante para o processo inflamatório.

O melhor conhecimento do mecanismo de invasão e a resposta da célula hospedeira *C. jejuni* são de suma importância para o controle e a prevenção da bactéria em humanos, já que atualmente, há alta incidência dessa bactéria e ela provoca secundariamente doenças auto-imunes graves.

## 2. Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo avaliar o processo e a rota de internalização, a fusão de lisossomos com vacúolos bacterianos, as alterações morfométricas das células em consequência da presença da bactéria e a indução da expressão de transcritos citocinas inflamatórias pela *C. jejuni* em células Caco-2.

### 3. Material e métodos

Os ensaios de invasão, participação de actina e tubulina no processo de internalização, alterações morfométricas celulares, expressão do RNA mensageiro para citocinas inflamatórias e fusão de lisossomos com fagossomo bacteriano foram realizados na linhagem celular Caco-2.

Para todos os ensaios, antes da infecção, as células foram mantidas em cultura durante 7 a 15 dias até se tornarem polarizadas. Após esse período, elas foram utilizadas nos experimentos.

#### 3.1. Internalização de *C. jejuni* em células CACO-2

Para verificar a invasão bacteriana foi utilizada cultura de células Caco-2 (BCRJ:CR069) do banco de células do Rio de Janeiro. As células Caco-2 são oriundas de adenocarcinoma de cólon humano primeiramente isoladas e cultivadas *in vitro* em 1977 por FOGH e colaboradores (PINTO et al. 1983). Essa célula apresenta capacidade de diferenciação espontânea em cultivo *in vitro* expressando muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino humano (ARTURSON e BORCHARD, 1997).

Durante o crescimento, as células Caco-2 formam uma monocamada de células cilíndricas. Após um período, as células se polarizam, com microvilosidades na borda apical, apresentando, ainda, as junções oclusivas entre células adjacentes e expressando atividades enzimáticas de hidrolases (PINTO et al., 1993)

Células Caco-2 polarizadas crescidas em garrafas foram utilizadas para avaliação com 5, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos após a inoculação. Para cada tempo, havia um grupo controle negativo e outro infectado em quadruplicata. Para infecção, uma alíquota de solução salina contendo  $2 \times 10^7$ UFC de *C. jejuni* IAL2383 foi colocada em uma garrafa com aproximadamente 80% de confluência, contendo 5mL de DMEM puro. Após os tempos estabelecidos, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS 3 vezes. As células foram retiradas com auxílio de um *cell scraper* e lavadas em PBS por centrifugação a 350xg force por 5 minutos.

A fim de retirar as bactérias aderidas, mas não internalizadas, os fragmentos foram lavados 5 vezes com solução Hank's (HBSS - Balanced Salt Solution) com cálcio e magnésio a 200xg por 5 minutos. Após, as células foram tratadas com gentamicina 100 µg/ml durante 1

hora para matar as bactérias aderidas. Novamente, houve 5 lavagens com solução de Hank's com cálcio e magnésio e centrifugação a 13.500xg por 10 minutos para retirada dos DNA das bactérias não internalizadas. As células foram submetidas ao tratamento com 1mL de 1% de tritomX100 durante 30 minutos para liberação das bactérias internalizadas. As amostras foram retiradas e diluídas na proporção de 1:10 e após, realizados ensaios de PCR em tempo real para contagem das bactérias internalizadas.

### **3.2. PCR em tempo real das amostras para quantificação de *C. jejuni* internalizados**

O real-time PCR foi realizado no BAX System de acordo as orientações do fabricante (User Guide, 2007). No laboratório, imediatamente após a chegada, as amostras foram diluídas na concentração de 1:10 Depois de homogeneizadas, alíquotas de 5 $\mu$ L foram transferidas para microtubos (Bioexpress, USA) contendo 200 $\mu$ L de solução de lise. A mistura foi aquecida a 37°C por 20 minutos e 95°C por 10 minutos, e depois transferida para bloco de resfriamento (2°C a 8°C) durante 5 minutos. Após resfriamento, 30 $\mu$ L do lisado foi transferido para os tubos de PCR contendo os primers para *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, dNTPs, a Taq-DNA polimerase, corante fluorescente, controle positivo interno e demais reagentes necessários para a PCR. Os tubos foram transferidos para o termociclador/detector, onde o programa pré-estabelecido no hardware do equipamento foi executado. Ao final do ciclo de amplificação e detecção, o equipamento automaticamente liberou os resultados identificando a espécie e o número de UFC.g<sup>-1</sup>. A cepa ATCC 33291 de *Campylobacter jejuni* foi processada em paralelo e utilizada também como controle positivo.

### **3.3. Participação do citoesqueleto na invasão de *C. jejuni***

Para verificar a participação dos filamentos de actina no processo de internalização, após 10 dias em cultivo, foi utilizada a citocalasina 5 $\mu$ M durante 1 hora em estufa de CO<sub>2</sub>. Foram utilizados 3 grupos experimentais em triplicata. O grupo 1 foi o controle positivo e era constituído de células não tratadas com o citocalasina mas infectadas com *C. jejuni*. O grupo 2 era constituído de células Caco-2, tratadas com citocalasina durante 1 hora e após infectadas com *C. jejuni*. O grupo 3 era constituído por células tratadas com citocalasina porém não infectadas com *C. jejuni*. Transcorrido o período de 1 hora de tratamento com a citocalasina, a droga foi retirada dos grupos 2 e 3 e lavadas com PBS. Após, os meios dos 3 grupos foram

trocados e os grupos 1 e 2 infectados com  $2 \times 10^7$  UFC de *C. jejuni* por garrafa e avaliados por PCR em tempo real nos tempos de 5, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos após a infecção.

Foram também realizados ensaios para verificar a participação da tubulina no processo de internalização utilizando nocodasol 10 $\mu$ M. Para o ensaio, havia 3 grupos experimentais em triplicata. O grupo 1 foi o controle positivo e era constituído de células não tratadas com o nocodazol mas infectadas com *C. jejuni*. O grupo 2 era constituído de células Caco-2 tratadas com nocodazol durante 1 hora e após infectadas com *C. jejuni*. O grupo 3, controle negativo, era constituído por células tratadas com nocodazol porém não infectadas com *C. jejuni*. Passado período de 1 hora a droga foi retirada dos grupos 2 e 3 e lavadas com PBS. Após, os meios dos 3 grupos foram trocados e os grupos 1 e 2 infectados com  $2 \times 10^7$  UFC de *C. jejuni* e avaliados com 30 minutos e 4 horas pós infecção.

Para verificar se a internalização da bactéria é dependente de actina e tubulina, após os períodos estabelecidos foi utilizado o mesmo protocolo de avaliação da internalização descrito no item 3.2.

### **3.4. Alterações morfométricas de células CACO-2 infectadas com *C. jejuni***

Para verificar as alterações morfométricas das células Caco-2, as mesmas foram crescidas em lamínulas em placas com 24 poços. Depois de diferenciadas, as células foram infectadas em triplicata com  $2 \times 10^7$  UFC por poço sendo que em cada tempo havia um grupo negativo em paralelo também em triplicata. Nos tempos 30 e 60 minutos de infecção as células foram coradas com Giemsa diluído 4 vezes durante 40 minutos. Todas as lamínulas foram avaliadas por análise computacional de imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus BX 40 com uma objetiva de 100X, acoplada a uma câmera Olympus Oly 200 conectado a um microcomputador PC através da placa digitalizadora Datatranslation 3153.

De cada lamínula, foram medidas utilizando-se o software HL Image (Western Vision Software) aproximadamente 36 células epiteliais de 6 a 8 diferentes campos aleatórios e de cada célula foram medidos o maior eixo e o eixo perpendicular.

### **3.5. Avaliação da fusão dos compartimentos lisossomais com vacúolos contendo *C. jejuni*.**

Para avaliação morfológica do processo de invasão foi utilizado crescimento de células Caco-2 em membrana *transwell* durante 10 dias a fim de se obter células polarizadas. Os ensaios foram realizados em duplicita para o grupo teste e em paralelo foi utilizado um

controle negativo. As células foram infectadas com  $2 \times 10^7$  UFC por poço contendo as células e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>.

Nos tempos de 15, 30, 60 minutos, 2 e 4 horas, as membranas contendo as células foram retiradas, lavadas e fixadas em solução de Karnovsk 1% (2,5% glutaraldeído, 2% paraformoldeído, 0,1M tampão cacodilato de sódio pH7,2M) durante 1 hora. Para marcação dos compartimentos lisossomais foi utilizada a fosfatase acida de acordo com o protocolo de Worth et al. (2009) com algumas modificações. Para tal ensaio, após a fixação as membranas permaneceram em tampão cacodilato de sódio durante 24 horas. Depois desse período, foram incubadas durante 1 hora em meio Gomori modificado (13,9mM de β-glicerofosfato, 1mM de nitrato de chumbo, 0,05M de tampão cacodilato de sódio pH5, 0,08% de cloreto de cálcio, 5% sacarose) e após marcação, as membranas foram extensivamente lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,2M) durante 6 horas.

O material foi desidratado em séries alcoólicas crescentes (50%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100%, 100%) ficando 5 minutos em cada banho. Posteriormente as amostras foram processadas em LR White com álcool na proporção de 1:1 por 24 horas a 37°C e após, incluídas em LR White puro mantidas em estufa de 60°C até total solidificação. Foram realizados cortes ultrafinos contrastados por acetado de uranila e nitrato de chumbo em telas de Nikel (BOZZOLA e RUSSELL, 1998). As telinhas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-109 acoplado ao sistema de captura de imagens Megaview<sup>G2</sup>/Olympus Soft Imaging Solutions.

### **3.6. Quantificação dos transcritos de citocinas inflamatórias em células Caco-2 por RT-qPCR**

Foram realizados ensaios em triplicata nos tempos 15, 30, 60, 120 e 240 minutos para produção de citocinas em células Caco-2. Para cada tempo havia um grupo de células infectadas com  $2 \times 10^7$  UFC de *C. jejuni* por garrafa e em paralelo, controle negativo também em triplicata sem a presença da bactéria.

Após os tempos estabelecidos, o meio contendo a bactéria foi descartado, as células foram lavadas, retiradas das garrafas com auxílio de um *cell scraper* e conservadas em ultrafreezer (-80°C) até o processamento. Para avaliação dos transcritos das citocinas IL 8, IL6, TGF beta-1 e CXCL-2 foi utilizado RT-PCR quantitativa em tempo real (reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase RT-PCR). Antes, das reações, os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados e cada *primer* foi padronizado.

### 3.6.1. Padronização dos oligonucleotídeos específicos

Foram desenhados pares de oligonucleotídeos iniciadores para cada uma das sequências gênicas das citocinas das espécie *Homo sapiens* (IL6, IL8, TGF, CXCL-2) e para os genes endógenos de referencia humana *B2M* (beta microglobulina), para se estabelecer o perfil transcripcional em amostras de células. Na tabela 1 estão descritos os oligonucleotídeos considerados viáveis quanto aos padrões de amplificação segundo o programa *Primer Express* versão 3.0.

Os oligonucleotídeos foram inicialmente testados em PCR convencional para a confirmação do fragmento amplificado e da ausência de *amplicons* inespecíficos. Para padronização foi utilizada fitohemaglutinina a 1mG/mL (KATIAL et al., 1998) durante 18 a 24 horas em contato com células Caco-2. As reações de PCR convencional para a amplificação dos oligonucleotídeos anteriormente descritos foram realizadas para um volume final de 20 ul contendo: 1uL de cDNA, 1U of Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 M dNTPs e 5.0 pmoles de *primers* direto e reverso. As condições das reações foram: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 40 s, 59°C por 50 s, 72°C por 50 s, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min.

Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 1,5 %, por 1 hora a 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X, corado com 0,5 µg/ml de syber safe (Invitrogen Brasil Ltda), visualizado por luz UV em um transluminador (L.PIX Loccus biotecnologia).

Tabela 1. Relação dos Oligonucleotídeos iniciadores para cada gene estudado.

Genes	Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	T°C de anelamento
CXCL-1 <i>H. sapiens</i>	CXCL-1 <i>forward</i>	GTGGCCACTGAAGTGC		
	CXCL-1 <i>Reverse</i>	GCTATGACTTCGGTTGGC	146	58
IL8- <i>H. sapiens</i>	IL8- <i>forward</i>	TGGAGAAGTTTTGAAGAGGGC		
	IL8- <i>Reverse</i>	GCATCTGGCAACCCTACAACA	149	60
IL6- <i>H.sapiens</i>	IL6- <i>Forward</i>	TCAGCCCTGAGAAAGGAGACAT		
	IL6- <i>Reverse</i>	GGTTGTTTCTGCCAGTGCC	76	58
TGF beta 1 <i>H. sapiens</i>	TGFβ-1 <i>forward</i>	AGTGGTTGAGCCGTGGAGG		
	TGFβ-1 <i>reverse</i>	AGAACAGGAAAGGCCGGT	53	58
(B2M) <i>H. sapienx</i>	B2M <i>forward</i>	AGCAGAGAATGGAAAGTCAA		
	B2M <i>reverse</i>	TGTTGATGTTGGATAAGAGAA		

### 3.6.2. Extração do RNA

A extração do RNA total das amostras de tecido e células foi realizada utilizando-se o Trizol Reagent® (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, as células foram adicionadas a 1mL de trizol. As amostras foram tratadas com a 0,2mL de clorofórmio e centrifugada a 20.500xg a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um microtubo e adicionada a 0,5mL de isopropanol, homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 10minutos para ser centrifugada a 20.500xg por 10minutos a 4°C. O pellet foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 7.500xg a 4°C e após secado e ressuspêndido em água DEPC para posterior quantificação por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm.

A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose e por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi feita em gel de agarose 1,5 %,

por uma hora a 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE 0,5 X, corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação *ImageSystem* – VDS, Amersham Biosciences). Em seguida, o ácido ribonucléico foi armazenado à -80°C para subsequentes análises.

### **3.6.3. Transcrição Reversa**

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 1 µg de RNA total (200ng/uL), 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20 µl com água tratada com DEPC. A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 1 hora. Reações controle foram realizadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA foi estocado a -20°C para posterior amplificação.

### **3.6.4. PCR para validação das amostras**

A qualidade do cDNA foi avaliada pela amplificação de um fragmento de 139 pb do gene constitutivo *B2M* (tabela 1). As condições desta reação foram: 1X tampão de PCR (20 mM Tris-HCl – pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v) (Invitrogen), 200 mM de dNTPs (Invitrogen), 5 pmoles de *primers* (Invitrogen), 1 U *Platinum®Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 3 µL de cDNA e água mili-Q utilizada para completar o volume final da reação para 20 µL. A reação ocorreu com um ciclo inicial de 95°C por 4 min, 35 ciclos de 94°C por 40 s, 59°C por 40s, 72°C por 50s e um ciclo final de 72°C por 5 min em termo ciclador PTC-100 (MJ Research Inc.). O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado com 0,5 mg/mL de syber safe (invitrogen).

### **3.6.5. Quantificação de mRNA por PCR em tempo real**

As quantificações relativas dos genes alvos para cada espécie (tabela 1) em relação ao gene de referência beta actina foram realizadas por PCR em tempo real a partir do cDNA transcritto reversamente de 100ng/µL de RNA total extraído de cada amostra. As reações de

PCR em tempo real para a amplificação dos oligonucleotídeos anteriormente descritos foram realizadas para um volume final de 10  $\mu$ l contendo: 2  $\mu$ l de cDNA, 5 $\mu$ l *Master Mix SYBR®Green PCR Core Reagents* ((Applied Biosystems) composto por: AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD, dNTPs com dUTP/dTTP), 5 pmoles de *primers* direto e reverso. As temperaturas de anelamento estão descritas na tabela 1.

Durante a amplificação, o número mínimo de ciclos para amplificação (*threshold*) relacionando os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo foi construído pelo sistema de análise *software*. Este valor, denominado Ct (“Cycle Threshold”) permitiu a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras. O Ct dos genes alvo foi corrigido pelos Ct dos genes controle de referencia (endógenos).

O Ct é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão dos transcritos do gene-alvo em uma determinada amostra, quanto menor for o número inicial do Ct obtido do gene-alvo existente na amostra, comparativamente com outro gene, é porque houve maior amplificação do gene-alvo e, conseqüentemente, o mesmo apresenta maior expressão.

Para obter a quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes em estudo (fold change), o grupo tratado foi comparado ao grupo controle pela metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001). Assim, o Ct do gene alvo foi normalizados do Ct do endógeno através da fórmula dCt. A subtração do valor de dCt do grupo controle e do grupo infectado forneceu o valor de ddCt e a partir daí foi encontrada o valor de *fold change* pela derivação da fórmula  $2^{-ddCt}$ . Para os resultados negativos de ddCt foi aplicada a fórmula  $-(2^{(ABS(ddCt))})$  e para os resultados positivos de ddCt a fórmula  $2^{ddCt}$  foi utilizada de acordo com o esquema simplificado abaixo.

Passos para se obter a quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes em estudo no grupo infectado em relação ao grupo controle (*fold change*):

1. Normalização (dCt):

$$dCt = Ct_f - Ct_e$$

2. Calibração (ddCt)

$$ddCt = dCt_{cn} - dCt_i$$

3. *Fold change*

$$\text{Se } ddCt < 0: -(2^{(ABS(ddCt))})$$

$$\text{Se } ddCt > 0: 2^{ddCt}$$

$\ell$ : gene de referencia (endógeno)

$f$ : gene alvo

$cn$ : controle negativo

$i$ : grupo infectado

### 3.7. Análise estatística

Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Sminorv para verificar a se os dados eram paramétricos. Obedecida a distribuição normal, foi utilizado o teste de Turkey para verificar a diferença entre o valor de dCt entre os grupos infectados e controle. Os gráficos para quantificação dos níveis transcricionais das citocinas foram construídos com base no valor de  $2^{-ddCt}$  (*fold change*) que o número relativo de vezes que o grupo infectado expressa o gene alvo em relação ao grupo controle.

Para os ensaios de participação do citoesqueleto foi realizada estatística descritiva.

As análises das variáveis foram realizadas com o uso do programa estatístico Graphpad Prism 5.

## 4. Resultados

### 4.1 Invasão de *C.jejuni* em células Caco-2

Os ensaios de internalização em células Caco-2 mostram que até o período de 5 minutos a bactéria não é capaz de entrar na célula e que a partir de 15 minutos a bactéria entra com um pico de internalização aos 60 minutos. A partir desse período não há diferenças significativas no nível de internalização (figura 1)

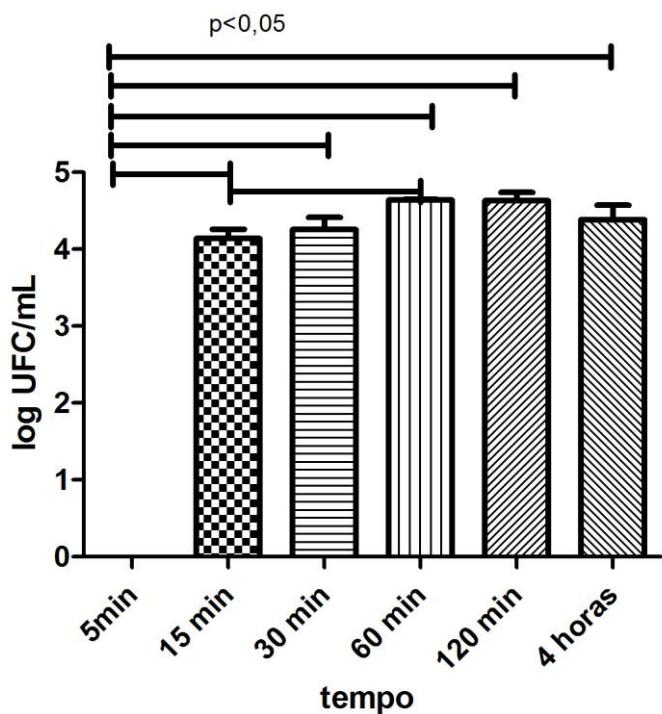


Figura 1. Quantificação de *C. jejuni* internalizada células Caco-2.

Os resultados de participação dos microfilamentos de actina e tubulina estão demonstrados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Quantificação *Campylobacter jejuni* (log UFC/mL) após tratamento com citocalasina.

	5min	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle positivo (média)	Au	4,00	4,00	4,69	4,41	4,34
Controle negativo	Au	Au	Au	Au	Au	Au
Tratado Citocalasina 1	Au	Au	4,69	<4	<4	4,00
Tratado Citocalasina 2	Au	Au	4,20	<4	<4	<4
Tratado Citocalasina 3	Au	Au	Au	<4	4,73	4,85

Au: ausente. Cada tratamento corresponde a uma repetição.

Tabela 3. Quantificação *Campylobacter jejuni* (log UFC/mL) após tratamento com nocodazol.

	30min	4hs
Controle positivo (média)	4,12	4,22
Controle negativo	Au	Au
Tratado Nocodazol 1	Au	<4,00
Tratado Nocodazol 2	Au	<4,00
Tratado Nocodazol 3	Au	4,00

Au: ausente. Cada tratamento corresponde a uma repetição.

Na MET foi encontrada a bactéria internalizada já a partir de 15 minutos de infecção. Nesse período, estavam presentes lisossomos contendo bactérias. Tanto bactéria como lisossomo foram percebidos nos tempo de 15 a 2 horas. No tempo de 4 horas foram visualizadas uma menor quantidade de lisossomos e a bactéria não foi visualizada. As bactérias foram visualizadas tanto próximas às zônulas de oclusão quanto na região perinuclear. No período de 1 hora ainda foram visualizadas bactérias próximas as microvilosidades (figuras 2.1, 2.2).

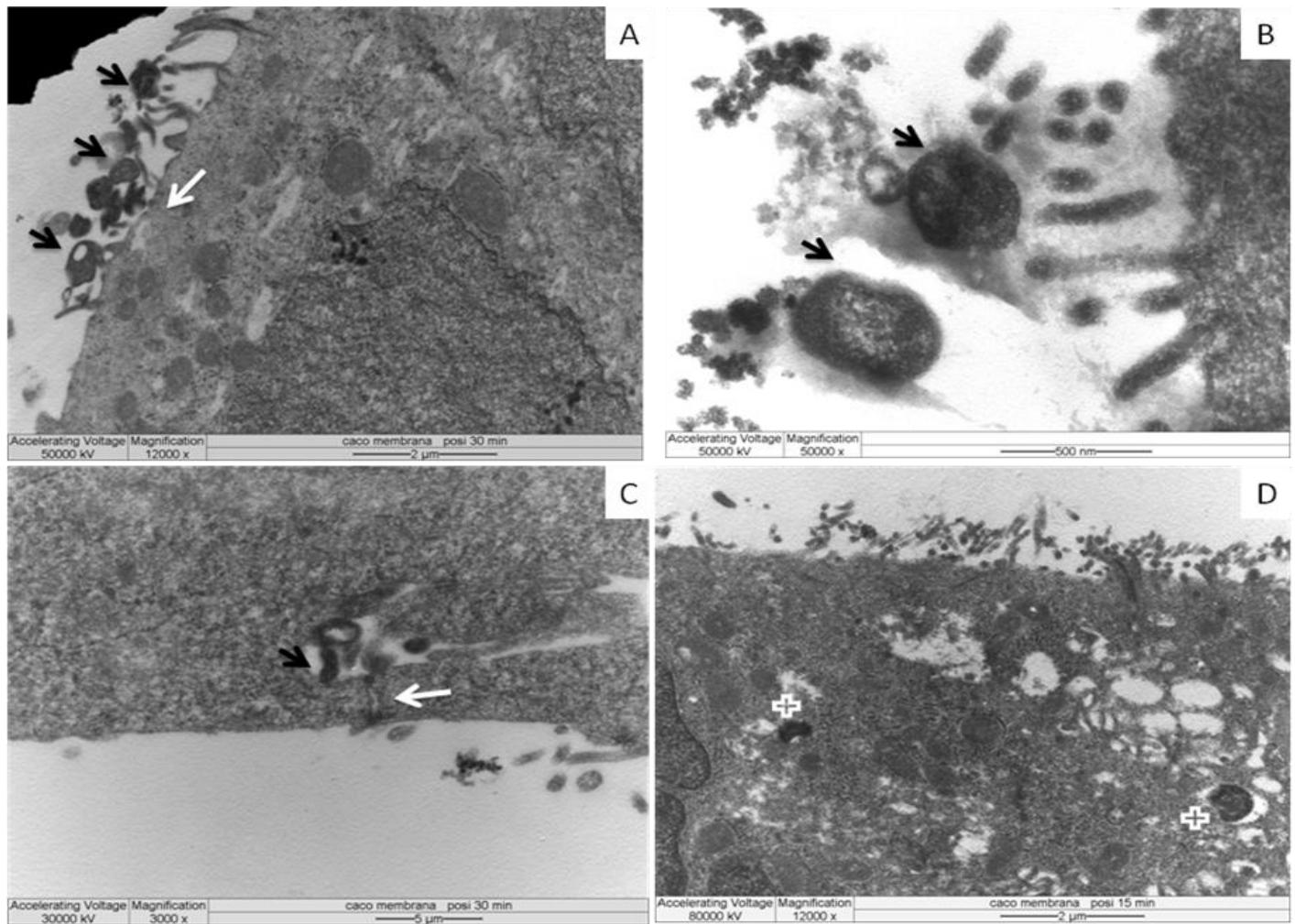


Figura 2.1. Eletromicrografia de transmissão de células Caco-2 mostrando a internalização de *C. jejuni* e a fusão com lisossomos. A e B: Presença de bactérias (seta preta) próximas às zonulas de oclusão (seta branca) com 15 e 60 minutos pós infecção respectivamente. C. Presença bactéria internalizada próxima a zonula de oclusão com 60 minutos pós infecção. D. Fusão entre lisossomo e a bactéria com 15 minutos pós infecção (cruz).

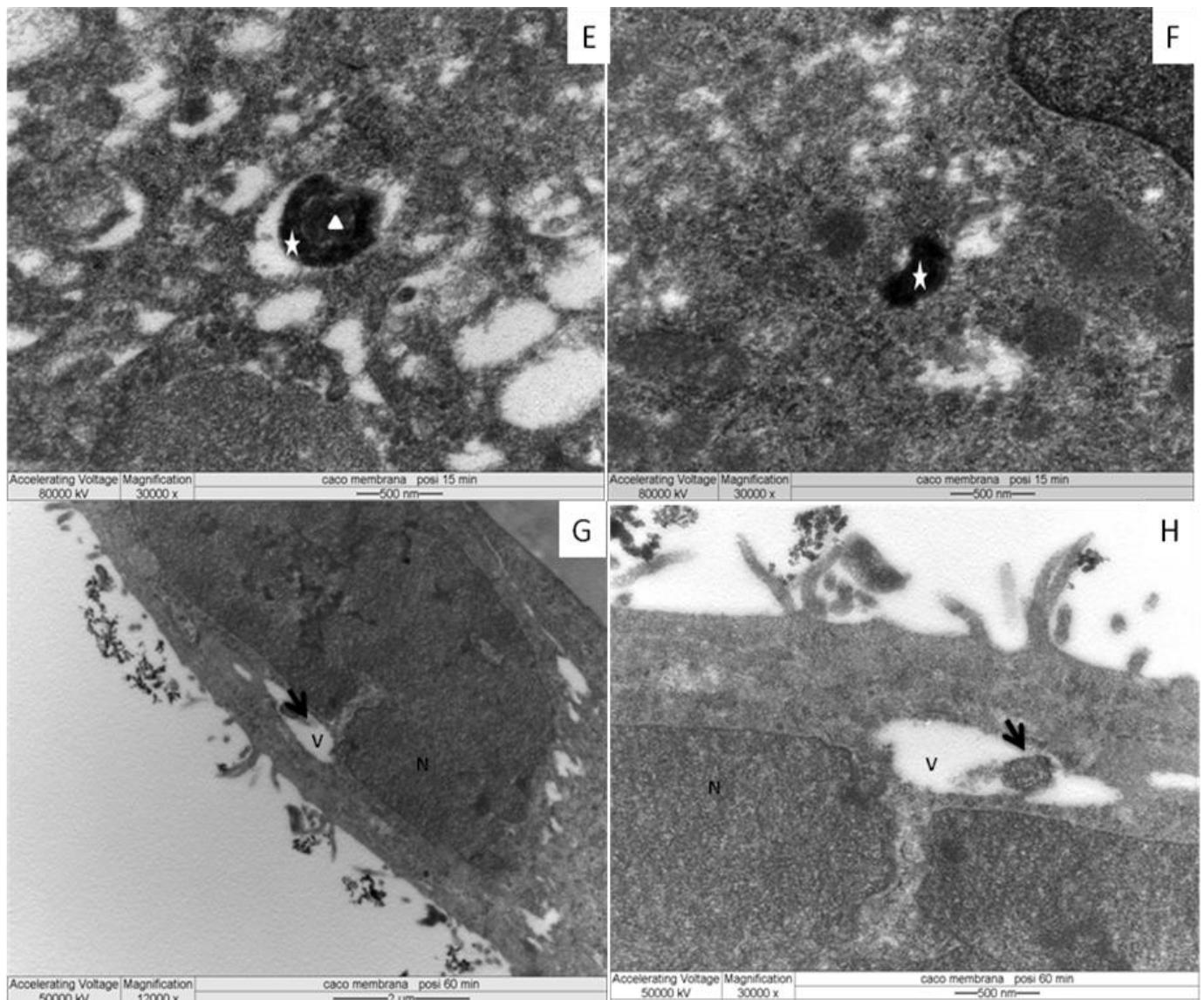
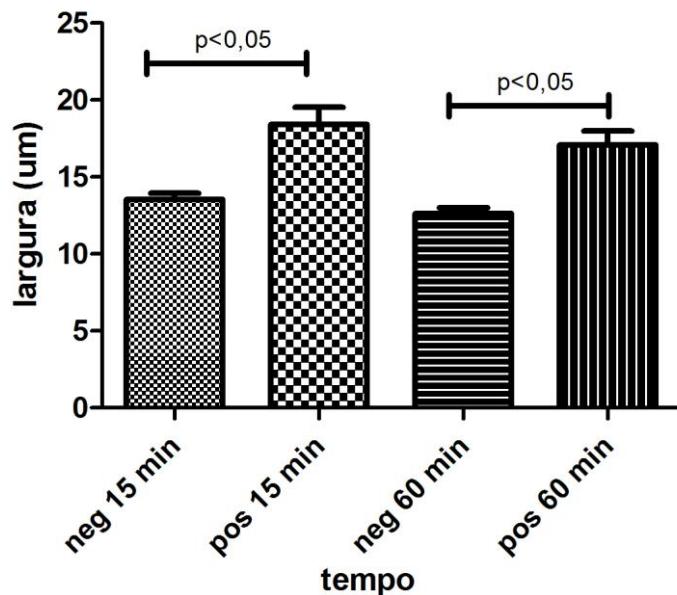


Figura 2.2. Eletromicrografia de transmissão de células Caco-2 mostrando a internalização de *C. jejuni* e a fusão com lisossomos. E, F: Fusão entre lisossomo e a bactéria com 15 minutos pós infecção (cruz) Na fotomicrografia E (aumento maior da figura 2.1.D.) é possível ver a bactéria (triângulo) e o lisossomo Lisossomo marcado com Fosfatase Ácida (estrela). G e H: Bactéria (seta preta) internalizada (V: vacúolo) na região perinuclear (N: núcleo) com 60 minutos pós infecção.

A avaliação morfométrica das células Caco-2 identificou aumento das medidas de diâmetro nos tempos de 15 e 60 minutos (figuras 3).



**Figura 3** - Morfometria (diâmetro) de células Caco-2 infectadas e não infectadas com *C.jejuni*.

A análise de dCt para os transcritos de CXCL-2 em células Caco-2, mostrou diferença estatística entre os grupos controle e teste apenas no tempo de 2 horas (tabela 4). No tempo de 2 horas o nível de expressão relativa (*fold change*) do grupo desafiado é 25 vezes maior que no grupo controle (figura 4).

Tabela 4. Valor de dCt para citocina CXCL-2 para os grupos desafiados com *C. jejuni* e os grupos controles células Caco-2

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	1,36 <sup>aA</sup>	4,16 <sup>aA</sup>	0,57 <sup>aA</sup>	2,7 <sup>aA</sup>	0,68 <sup>aA</sup>
Teste	0,68 <sup>aA</sup>	1,17 <sup>aA</sup>	0,047 <sup>aA</sup>	-1,46 <sup>aB</sup>	-0,59 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

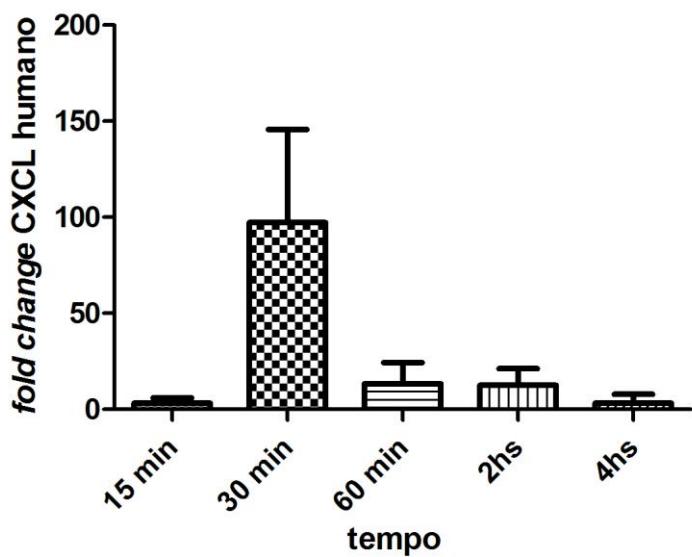


Figura 4. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de CXCL-2 das células desafiadas com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (*fold change*).

A análise de dTC das citocina IL-8 em células Caco-2 mostra que não há alteração dos níveis transpcionais com o tempo devido as efeitos da cultura. Porém, a partir de 60 minutos há uma diminuição do dTC no grupo tratado comparado ao grupo teste (tabela 5). A figura 5 mostra que o nível de expressão relativa (*fold change*) em relação ao grupo controle. IL-8 aumenta em 14, 28 e 6 vezes quando células Caco-2 são desafiadas com *C. jejuni* nos períodos de 60 minutos, 2 e 4 horas respectivamente quando comparado ao grupo controle.

Tabela 5. Valor de dCt para citocina IL-8 para células Caco-2 desafiadas com *C. jejuni* e o grupo controle.

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	9,25 <sup>aA</sup>	9,66 <sup>aA</sup>	11,23 <sup>aA</sup>	11,15 <sup>aA</sup>	9,45 <sup>aA</sup>
Teste	10,60 <sup>aA</sup>	7,84 <sup>aA</sup>	7,23 <sup>aB</sup>	6,85 <sup>aB</sup>	6,94 <sup>aB</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística.

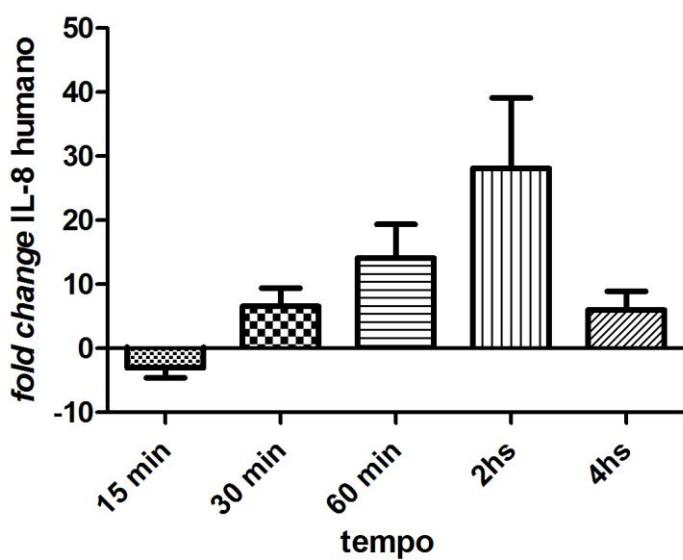


Figura 5. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de IL8 dos grupos de células Caco-2 desafiados com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (*fold change*).

Não houve diferença entre os grupos teste e controle para os valores de dCt para a citocina IL-6 em células Caco-2 (tabela 6). Os níveis de expressão (*fold change*) de IL-6 das células desafiadas em relação as células controle podem ser visto no gráfico (figura 6).

Tabela 6. Valor de dCt para citocina IL-6 para as células desafiadas com *C. jejuni* e os grupos controles.

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	11,73 <sup>aA</sup>	10,61 <sup>aA</sup>	10,70 <sup>aA</sup>	9,73 <sup>aA</sup>	7,85 <sup>aA</sup>
Teste	8,14 <sup>aA</sup>	8,76 <sup>aA</sup>	7,38 <sup>aA</sup>	7,24 <sup>aA</sup>	7,88 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

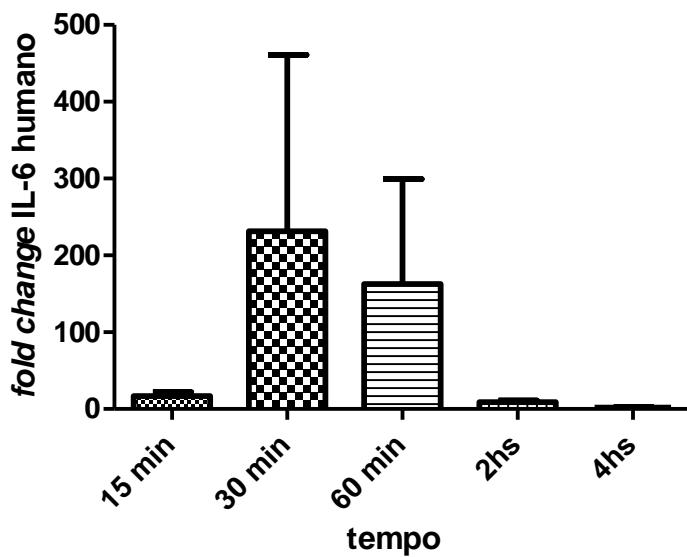


Figura 6. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de IL6 dos grupos de celulas Caco-2 desafiados com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (*fold change*)

Houve diferença entre os grupos teste e controle para os valores de dCt para a citocina TGF $\beta$ -1 em células Caco-2 no tempo de 15 minutos (tabela 7). No tempo inicial de infecção há uma expressão 19 vezes maior dos transcritos dessa citocina no grupo desafiado comparado ao grupo controle (figura 7)

Tabela 7. Valor de dCt para citocina TGF para células Caco desafiadas com *C. jejuni* e os grupos controles.

	15min	30min	60min	2hs	4hs
Controle	3,35 <sup>aA</sup>	2,94 <sup>bC</sup>	3,63 <sup>bC</sup>	2,44 <sup>b</sup> <sup>bC</sup>	2,73 <sup>bC</sup>
Teste	1,21 <sup>aB</sup>	4,40 <sup>bC</sup>	4,49 <sup>bC</sup>	2,27 <sup>bC</sup>	1,84 <sup>bC</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística.

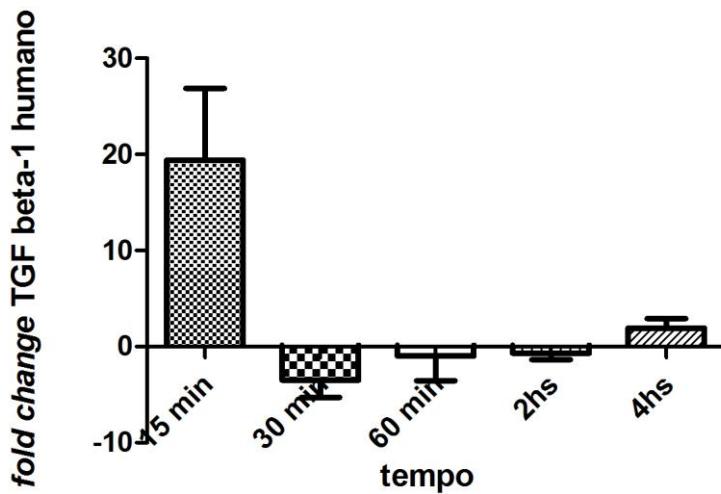


Figura 7. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de TGF $\beta$ -1 dos grupos de células Caco-2 desafiados com *C. jejuni* em relação ao grupo controle (*fold change*).

## 5. Discussão

Na avaliação morfométrica foi verificada alterações no diâmetro das células. Essa anomalia já foi descrita na literatura sendo a proteína CDT a principal incriminada (JEON; ITOH; RYU; 2005; SMITH; BAYLES, 2006). Essa toxina depois de levar a um efeito distensor nas células provoca apoptose com fragmentação do DNA (JAIN et al., 2009).

A alteração do tamanho das células epiteliais causada pela CDT é um mecanismo importante para patogenia da doença, pois a posterior morte celular já identificada por outros autores pode comprometer a permeabilidade intestinal e facilitar a entrada de bactérias para camadas mais profundas da mucosa intestinal.

*Campylobacter jejuni* invadiu células Caco-2 em períodos superiores a 5 minutos com um pico de quantificação de 60 minutos. Como a quantidade de bactéria não aumentou em períodos superiores à 60 minutos é possível que a multiplicação bacteriana intracelular não seja um mecanismo importante no caso da *C. jejuni* como ocorre para espécies de *Salmonella* (MÉRESSE et al., 2001; UNSWORTH et al., 2004). A multiplicação intravacuolar para *C. jejuni* foi descrita por Konkel et al. (1992). Como foi utilizada PCR em tempo real, pode-se afirmar que a bactéria entra na célula, porém não se sabe se ela continua viável durante todo o período. Deun et al. (2008) verificou uma diminuição da quantidade de bactérias no interior de células T84 humana e para uma das cepas utilizadas ele não encontrou bactéria viável após o período de 18 horas para uma das cepas testadas.

Nesse trabalho, *Campylobacter jejuni* foi observada tanto na região perinuclear quanto próximo a zônula de oclusão em células Caco-2. Tais achados corroboram com Hu e Kopecko (1999) que afirmam a existência da posição perinuclear e para esses autores a bactéria se move para essa região ao longo dos microtúbulos. Também, o rompimento e a posição próxima a zônula de oclusão foram observados no processo de internalização (MACCALLUM *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2008).

Algumas bactérias desenvolvem um sistema de evasão desenvolvendo adaptações que garantem a sobrevivência e replicação do parasita no interior de diferentes compartimentos intracelulares nas células hospedeiras. Exemplo disso é a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* no bloqueio da fusão lisossomal às inclusões bacterianas, *Listeria monocytogenes* no escape de vesículas fagocíticas para a replicação no citoplasma (HACKSTADT, 1998). e *Coxiella burnetti* ou *Salmonella* na adaptação a compartimentos ácidos (OH *et al.*, 1996; HACKSTADT, 1998).

No presente estudo identificou-se a fusão dos compartimentos lisossomais com o vacúolo bacteriano já com 15 minutos após a infecção com a bactéria. Caso a bactéria seja eliminada pelos lisossomos, provavelmente, toxinas liberadas por esse patógeno são responsáveis por desencadear a resposta imune. *Campylobacter jejuni* pode usar um mecanismo similar a *Salmonella* conforme já descrito por Oh *et al.* (1996) e se adaptar aos comportamentos lisossomais.

Os achados de negatividade em células Caco-2 após tratamento com nocodazol ou citocalasina prova que há uma participação da actina e tubulina na entrada bacteriana (tabelas 2 e 3). No caso da citocalasina os resultados são consistentes a ponto de se afirmar que com 15 minutos após a infecção há participação dos filamentos de actina. No tempo de 30 minutos também foi encontrado um resultado negativo e dois resultados positivos. Pode-se questionar o fato de o PCR em tempo real ser uma ferramenta altamente sensível para esse tipo de diagnóstico. Porém, além de ter sido utilizado um grupo controle com resultados consistentes durante todo o período, um resultado falso negativo para um teste tão sensível como PCR em tempo real é muito difícil ocorrer. A partir de 1 hora *C. jejuni* internaliza mesmo com o tratamento prévio com citocalasinacitocalasina.

Para análise da tubulina, foram utilizados apenas os períodos de 30 minutos e 4 horas. Mesmo assim, os resultados desse trabalho levam a concluir que a participação de actina e tubulina ocorrem em períodos precoces. O envolvimento dos microfilamentos em períodos precoces pode estar ligado à sobrevida da droga que talvez diminua com o tempo. Mesmo internalizada, após 1 hora há um valor inferior a 4 logUFC/mL. Infelizmente, o *software*

utilizado para esse sistema de PCR em tempo real não permite saber qual o valor exato do número <4 logUFC/mL e em consequência, se há diferença estatística em relação ao o controle positivo.

Alguns autores relatam que a internalização de *C. jejuni* é exclusivamente actina-dependente (de MELO et al., 1989; KONKEL e JOENS, 1989; MONTEVILLE et al., 2003). Para Biswas et al. (2003) o processo é tanto actina como microtubulo dependente. Mas Russell e Blake (1994) citam que nem actina nem tubulina participam do processo. Contudo a invasão microtúbulo dependente tem ganhado importância (OELSCHLAEGER et al., 1993; HU e KOPECKO, 1999). Entretanto, a participação do citoesqueleto parece ser cepa dependente (DEUN et al., 2008).

A citocina IL-8 realiza um papel de quimioatração potente, ativando as células do sistema imune o que é muito importante para a resposta do hospedeiro a *C. jejuni* e alguns autores afirmam que a secreção dessa citocina em resposta a *C. jejuni* é dose dependente. O trabalho de MacCallum (2006) mostra que a liberação de IL-8 em resposta a *C. jejuni* é relacionada ao tipo celular. Esses autores verificaram participação dessa citocina em níveis basais em células Caco-2 infectadas com *C. jejuni*. Apesar de nesse estudo ter sido utilizado RT-qPCR em tempo real e no estudo antes citados, ensaios de Elisa, os resultados do presente trabalho mostram que a significativa expressão de transcritos de IL-8 ocorre a partir de 60 minutos até o tempo de 4 horas.

A quantificação dos transcritos de IL-6 na resposta inata aqui encontrada não foi significativa. Isso pode ser explicado pelos tempos precoces da célula em cultura. Já que a importância da IL-6 como citocina pro inflamatória parece estar ligado concomitante aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  (HENDERSON et al., 1998). Pode ser que em tempos tardios, tal citocina seria expressa. Friis et al. (2009) verificou a secreção de IL-6 em células Caco-2 infectadas.

A citocina TGF beta1 apresentou altos níveis de transcritos apenas no período inicial após infecção com um decréscimo após 30 minutos. Os membros da família TGF- $\beta$  parecem ter um papel essencial na regulação da resposta imune e é importante para a homeostasia intestinal (Sanchez-Munoz et al., 2008). A maior expressão dos transcritos dessa citocina no período de 15 minutos pode ser uma tentativa de modular a resposta a bactéria. Todavia, devido ao aumento de IL-8 e CXCL-2 ambas pro inflamatórias, é possível que essa modulação por TGF- $\beta$ 1 não resulte em sucesso.

## 6. Conclusão

*Campylobacter jejuni* invade células epiteliais Caco-2 próximo a zônula de oclusão podendo ser encontrada na região perinuclear. Sua entrada provoca um aumento do tamanho das células em tempos precoces de infecção. Após entrada, os compartimentos lisossomais se fundem com o fagossomo contendo a bactéria.. Em resposta a bactéria ou a produtos resultantes de sua digestão, as células aumentam os níveis de transcritos das citocinas IL-8 e CXCL-2 e apesar de também aumentar transcritos de TGF- $\beta$ 1, seu pico de expressão é precoce diminuindo com o decorrer do tempo, caracterizando um perfil de citocinas que induziriam um processo inflamatório.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 1. Conclusão Geral

A cepa virulenta de *Campylobacter jejuni* IAL 2383 é capaz de penetrar pelos poros das cascas de ovos, se multiplicar em vitelos de embriões durante o todo o período de incubação dos ovos de galinha e levar a alta mortalidade precoce. Em *explants* de intestino de embriões e aves SPF essa bactéria leva a um aumento do tamanho das células.

Em *explants* de aves SPF com 25 dias de idade *C. jejuni* invade os enterócitos o que leva a um aumento dos níveis de transcritos para as citocinas IL1 $\beta$  com 4 horas de contato e TGF beta-3 com 15 minutos de contato sem persistência até o período de 4 horas. As citocinas IL-8 e IL-6 e a quimiocina CXCL-2 não alteram os níveis transcripcionais na presença da bactéria.

Em células Caco-2 *C. jejuni* invade com a participação de actina e microtúbulos e se localiza próximo as zonulas de oclusão ou na região perinuclear. Já em períodos precoces, há fusão da bactéria com os compartimentos lisossomais e um aumento do diâmetro celular. Em resposta, há um aumento dos níveis transcripcionais de IL-8 a partir de 30 minutos de contato e CXCL-2. TGF beta-1 também tem um pico de transcritos com 15 minutos de contato sem persistência, mas a citocina IL-6 não aumenta seus níveis.

Os resultados desse trabalho mostram que em determinadas circunstâncias *C. jejuni* pode entrar em ovos e matar embriões não sendo apenas um microrganismo comensal para aves. Em células humanas a participação de microtúbulos e microfilamentos de actina é importante para o processo de invasão e há fusão com os compartimentos lisossomais. Durante a invasão a presença da bactéria leva a um aumento dos níveis transcripcionais de citocinas e quimiocinas pro inflamatórias importantes para a resposta imune.

## 2. Perspectivas

Esse trabalho propõe um modelo de cepa de *C. jejuni* que pode ser utilizado para os ensaios de patogenia já que essa cepa apresentou e expressou transcritos dos principais genes de virulência.

O capítulo 2 mostra a possibilidade de *C. jejuni* penetrar em ovos de galinha, sobreviver, se multiplicar em vitelos de embriões e levar a mortalidade embrionária precoce. Esse achado é o primeiro dado experimental já descrito e é importante para avaliação epidemiológica principalmente em ambientes com alta temperatura. Assim, em locais onde não há controle da temperatura ambiental durante o armazenamento

dos ovos associado a outros fatores como, por exemplo o estado imune da galinha, essa bactéria pode ter importância tanto em termos epidemiológicos como patogênicos

O capítulo 3 abre uma grande frente de pesquisa para definitivamente se avaliar se a relação de *C. jejuni* e aves é apenas comensal. Assim, ensaios posteriores com células de aves devem ser realizados para verificar se há expressão de transcritos e secreção de citocinas inflamatórias em períodos posteriores a 4 horas e se há relação com outras citocinas anti-inflamatórias ou imunomoduladoras. Outra linha importante é a avaliação do mecanismo de invasão e tráfego no epitélio intestinal. Tais estudos são importantes, mas ainda há muitas dificuldades de se realizar tais pesquisas em aves. Alguns fatores como por exemplo, a dificuldade em se encontrar kits para avaliar secreção de citocinas para aves e também, linhagens de células intestinais estabelecidas para esses animais.

O capítulo 4 apresentou resultados interessantes sobre o processo de invasão de *C. jejuni* em células Caco-2, no entanto outros trabalhos devem ser realizados como, por exemplo, avaliando as vias de entrada utilizadas por essa bactéria e a estratégia de sobrevivência intracelular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUOUN, M.; MANNING, G.; CAWTHRAW, S. A.; RIDLEY, A.; AHMED, I. H.; WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. Cytolethal Distending Toxin (CDT)-Negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. **Infection and Immunity**, v.73, n.5, p.3053-3062, 2005.
- ADESIYUN, A.; OFFIAH, N.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; LASHLEY, V.; MUSAI, L.; GEORGES, K. Microbial health risk posed by table eggs in Trinidad. **Epidemiology and Infection**, v.133, p.1049–1056, 2005.
- AHMED, I. H.; MANNING, G.; WASSENAAR, T. M.; CAWTHRAW, S.; NEWELL, D. G. Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials. **Microbiology**, v.148, p.1203-1212, 2002.
- AIRES, D.L. (2007) Statistical applications in Biomedical Sciences. Bioestat Software.
- ALLEN, K.J. & GRIFFITHS, M.W. Use of luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 to assess eggshell colonization and penetration in fresh and retail eggs. **Journal of Food Protection**, v.64, p. 2058–2062, 2001.
- AL-SALLOOM, F.S.; AL, M.A.; ISMAEEL, A.; BOTTA, G.A; BAKHET, M. *Campylobacter*- stimulated INT407 cells produce dissociated cytokine profiles. **Journal of Infectious Diseases**, v.47, p.217-224, 2003.
- ARTURSSON, P.; BORCHARD, R.T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell culture:Caco-2 and beyond. **Pharm Research**.v. 14, n. 12, p.1655-1658, 1997.
- ASHGAR, S. S.; OLDFIELD, N.J.; WOOLDRIDGE, K.G.; JONES, M.A.; IRVING, J.; TURNER, D.P.J.; ALAÀLDEEN, A.A. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. **Journal Bacteriology**, v.189, n. 5, p.1856–1865, 2007.
- BACON, D.J.; ALM, R.A.; BURR, D.H.; HU, L.; KOPECKO, D.J.; EWING, C.P.; TRUST, T.J.; GUERRY, P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infection and Immunity**, v.68, p.4384-4390, 2000.
- BACON, D. J.; SZYMANSKI, C.M.; BURR, D.H.; SILVER, R.P.; ALM, R.A.; GUERRY, P. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Molecular Microbiology**, v.40, p.769–777, 2001.
- BACON, D. J.; ALM, R.A.; HU, L.; HICKEY, T.E.; EWING, C.P.; BATCHELOR, R.A.; TRUST, T.J.; GUERRY, P. DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infection and Immunity**, v.70, n.11, p.6242–6250, 2002.
- BAR-SHIR, E. & FRIEDMAN, A. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. **Developmental & Comparative Immunology**, v.30, p.930–941, 2006.

- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1996.
- BEERY, J. T.; HUGDAHL, M. B.; DOYLE, M. P.. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. **Applied Environment Microbiology**, v.54, p.2365-2370, 1988.
- BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U.. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v.75 p.5993–6007, 2007.
- BISWAS, D.; ITOH, K.; SASAKAWA, C. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*. **Microbiology Immunology**, v.47, p.469-473, 2003.
- BISWAS, D.; FERNANDO, U.; REIMAN, C.; WILLSON, P.; TOWNSEND, H.; POTTER, A.; ALLAN, B. Correlation between in vitro secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. **Current Microbiology**, v.54, p.207–212, 2007.
- BLACK, R. E.; LEVINE, M. M.; CLEMENTS, M. L.; HUGHES, T. P.; BLASER, M. J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v.157, p.472–479, 1988.
- BLASER, M. J.; SAZIE, E.; WILLIAMS, P. The influence of immunity on raw milk associated *Campylobacter* infection. **The Journal of the American Medical Association**, v. 257, p. 43-46, 1987.
- BONITA, R.; Doenças transmissíveis: Epidemiologia, vigilância e resposta. IN: BEAGLEHOLE, R.; KJELLSTRÖM, T. *Epidemiologia básica*, Santos: OMS, 2010. p.117-131.
- BORSOI, A.; SANTIN, E.; SANTOS, L. R.; SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulse field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v. 88, p. 750-758, 2009.
- BOZZOLA, J.; RUSSELL, L. (1998) Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy. In: 2, 2. (Ed.) pp. 48—72 (Sudbury, Jones and Bartlett).
- BRAS, A. M.; CHATTERJEE, S.; WREN, B. W.; NEWELL, D. G.; KETLEY, J. M. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.3298–3302, 1999.
- BRÁS, A.M.; KETLEY, J.M. Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarised epithelial monolayers. **FEMS Microbiology Letters**. v.179, p.209-215, 1999.

BRISBIN, J.T.; GONG, J.; PARVIZI, P.; SHARIF, S. Effects of Lactobacilli on Cytokine Expression by Chicken Spleen and Cecal Tonsil Cells. **Clinical and Vaccine Immunology**, n.9, v.17, p. 1337–1343, 2010.

BUHR, R.J.; MUSGROVE, M.T.; RICHARDSON, L.J.; COX, N.A.; WILSON, J.L.; BAILEY, J.S.; COSBY, D.E.; BOURASSA, D.V. Recovery of *Campylobacter jejuni* in feces and semen of caged broiler breeder roosters following three routes of inoculation. **Avian Diseases**, v.49, p.577–581, 2005.

BUHR, R.J.; COX JR, N.A.; STERN, N.J.; MUSGROVE, M.T.; WILSON, J.L.; HIETT, K.L. Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. **Avian Diseases**, v.46, p.919-924, 2002.

BYRNE, C. M.; CLYNE, M.; BOURKE, B. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. **Microbiology**, v.153, p.561–569, 2007.

CAMARDA, A.; NEWELL, D.G.; NASTI, R.; DI MODUGNO, G. Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. **Avian Diseases**, v.44, p.907–912, 2000.

CARRILLO, C.D.; TABOADA, E.; NASH, J.H.; LANTHIER, P.; KELLY, J. LAU, P.C.; VERHULP, R.; MYKYTCZUK, O.; SY, J.; FINDLAY, W.A.; AMOAKO, K.; GOMIS, S.; WILLSON, P.; AUSTIN, J.W.; POTTER, A.; BABIUK, L.; ALLAN, B.; SZYMANSKI, C.M. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flaA. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.20327–20338, 2004.

CAWTHRAW, S.; AYLING, R.; NUIJTEN, P.; WASSENAAR, T.; NEWELL, D. G. Isotype, specificity, and kinetics of systemic and mucosal antibodies to *Campylobacter jejuni* including flagellin, during experimental oral infections of chickens. **Avian disease**, v. 38, n.2, p.341-349, 1994.

CHEN, M.L.; GE, Z.; FOX, J.G.; SCHAUER, D.B. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v.74, p.6581-6589, 2006.

CHEN, J.; SUN, X.T.; ZENG, Z.; YU, Y.Y. *Campylobacter enteritis* in adult patients with acute diarrhea from 2005 to 2009 in Beijing, China. **Chinese Medical Journal**, n.10, vol.124, p.1508-1512, 2011.

CHRISTIE, P. J.; J. P. VOGEL. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends Microbiology**, v.8, p.354-360, 2000.

CHRISTIE, P.J. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. **Molecular Microbiology**, v.40, p.294–305, 2001.

CLARK, M.A.; JEPSON, M.A.; SIMMONS, N.L.; HIRST, B.H. Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. **Research in Microbiology**, v.145, p.543-552, 1994.

COX, N.A.; BAILEY, J.S.; RICHARDSON, L.J.; BUHR, R.J.; COSBY, D.E.; WILSON, J.L.; HIETT, K.L.; SIRAGUSA, G.R.; BOURASSA, D.V. Presence of naturally occurring *Campylobacter* and *Salmonella* in the mature and immature ovarian follicles of late-life broiler breeder hens. **Avian Diseases**, v.49, p.285–287, 2005.

COX, N.A.; WILSON, J.L.; MUSGROVE, M.T.; BUHR, R.J.; SANDER, J.E.; HUDSON, B.P. Positive relationship of avian leukosis-J strain virus to the detection of *Campylobacter* in the digestive tract and semen of broiler breeder roosters. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.13, p.44–47, 2004.

DANN, S.M.; ECKMANN, L. Innate immune defenses in the intestinal tract. **Current Opinion Gastroenterology** v.23, p.115-120, 2007.

DAY, W. A. JR, SAJECKI, J. L.; PITTS, T. M.; JOENS, L. A. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. **Infection and Immunity**, v.68, p.6337–6345, 2000.

DE BOER, P.; WAGENAAR, J.A.; ACHTERBERG, R.P.; VAN PUTTEN, J.P.; SCHOUWS, L.M.; DUIM, B. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity *in vivo*. **Molecular Microbiology**, v.44, p.351–359, 2002.

DE MELO, M.; GABBANI, G.; PECHERE, J. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEp-2 cells. **Infection and Immunity**, v.57, p.2214–2222, 1989.

DEUN, K. V.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; FLAHOU, B.; VISSENBERG, K.; MARTE., A.; BROECK, V.; IMMERSSEL, F.V.; HAESEBROUCK, F. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. **Veterinary microbiology**, v.130, p.285-297, 2008.

DHILLON, A. ;SHIVAPRASAD, H. ; SCHABERG, D. ; WIER, F. ; WEBER, S. ; BANDLI, D. *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. **Avian Disease**, v.50, p.55–58, 2006.

EFSA. The Community Summary Report Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 223, 2009.

EVANS, S.L. Introduction and spread of thermophilic campylobacters in broiler flocks. **Acta veterinaria Scandinavica**. v. 27, p. 540-547, 1997.

Everest, P. ; Ketley, J. ; Hardy, S.; DOUGE, G.; KHAN,S.; SHEA, J.; HOLDEN, D.; MASKELL, D.; DOUGAN, G. Evaluation of *Salmonella typhimurium* mutants in a model of experimental gastroenteritis. **Infection and Immunity**, v.67, p.2815-2821, 1999.

EVEREST, P. H.; GOOSSENS, H.; SIBBONS, P.; LLOYD D. R.; KNUTTON, S.; LEECE, R.; KETLEY, J. M.; WILLIAMS, P. H. Pathological changes in the rabbit ileal loop model caused by *Campylobacter jejuni* from human colitis. **Journal of Medicine Microbiologic**, v.38, p. 316-321, 1993.

FOUTS, D. E.; MONGODIN, R.G.; MANDRELL, R.E.; MILLER, W.G.; RASKO, D.A.; RAVEL, J.; BRINKAC, L.M. et al. Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. **PLoS Biology**. v.3, p.15, 2005.

FOX, J. G.; ROGERS, A.B.; WHARY, M.T.; GE, Z.; TAYLOR, N.S.; XU, S.; HORWITZ, B.H.; ERDMAN, S.E. Gastroenteritis in NF-κB-deficient mice is produced with wild-type *Campylobacter jejuni* but not with *C. jejuni* lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains. **Infection and Immunity**, v.72, p.1116–1125, 2004.

FRIIS, L.M.; KEELAN, M.; TAYLOR, D.E. *Campylobacter jejuni* Drives MyD88-Independent Interleukin-6 Secretion via Toll-Like Receptor 2. **Infection and Immunity**, n.4, v.77, p. 1553–1560, 2009.

GAL-MOR, O.; FINLAY, B. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**. v.8, p.1707-1719, 2006.

GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J.; FROST, J.A.; ADAK, G.K.; HORBY, P.; SWAN, A.V.; PAINTER, M.J.; NEAL, K.R. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.8, p.937–942, 2002.

GRANT, C. C.; KONKEL M.E. ; CIEPLAK, W.; JR.; TOMPKINS, L.S. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. **Infection and Immunology**, v.61, p.1764-1771, 1993.

GUO, X.; CHEN, J.; BEUCHAT, L.R; BRACKETT, R.E. PCR detection of *Salmonella enteric* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from HilA. **Applied Environment Microbiology**, p. 5248-5252, 2000.

HACKER, J.; BENDER, L.; OTT, M.; WINGENDER, J.; LUND, B.; MARRE, R.; GOEBEL, W. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysin occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**. v.8, p.213-25, 1990.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review Microbiology**. v. 54, p.641-679, 2000.

HACKSTADT, T. The diverse habitats of obligate intracellular parasites. **Current Opinioun in Microbiology**, v.1, n.1, p.82-87, 1998.

HÄNEL, I.; MULLER, J.; MULLER, W.; SCHULZE, E. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 75–82, 2004.

HÄNNINEN, M.; PERKO-MÄKELÄ, P.; PITKÄLÄ, A.; RAUTELIN, H. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1998-2000, 2000.

HARMON, K.M.; RAMSOM, G.M.; WESLEY, I.V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v.11, p.195–200, 1997.

HAZELEGER, W.C.; WOUTERS, J.A.; ROMBOUTS, F.M.; ABEE, T. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3917±3922, 1998.

HENDERSON, B., POOLE, S.; WILSON, M. 1998. Bacteria/cytokine interactions in health and disease. London: Portland Press, p. 375.

HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.68, p.692-744, 2004.

HENDRIXSON, D. R; DIRITA, V. J. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. **Molecular Microbiology**, v.52, p.471–484, 2004.

HENDRIXSON, D.R.; AKERLEY, B.J.; DIRITA, V.J. Transposon mutagenesis of *Campylobacter jejuni* identifies a bipartite energy taxis system required for motility. **Molecular Microbiology**, v.40, p.214-224, 2001.

HICKEY, T.E.; BAQAR, S.; BOURGEOIS, A.L.; EWING, C.P; GUERRY, P. *Campylobacter jejuni*-stimulated secretion of interleukin-8 by INT407 cells. **Infection and Immunity**, v.67, p.88-93, 1999.

HICKEY, T. E.; MAJAM, G.; GUERRY, P. Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytolethal distending toxin. **Infection and Immunity**, v.73, p.5194–5197, 2005.

HICKEY, T. E.; MCVEIGH, A.L.; SCOTT, D.A.; MICHELUUTTI, R.E.; BIXBY, A.; CARROLL, S.A.; BOURGEOIS, A.L.; GUERRY, P. *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Mediates Release of Interleukin-8 from Intestinal Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v.68, p.6535–6541, 2000.

HIETT, K.L.; COX, N.A; STERN, N.J. Direct polymerase chain reaction detection of campylobacter spp. in poultry hatchery samples. **Avian Diseases**, v.46, p.219–223, 2002.

HU, L.; KOPECKO J. Cell Biology of Human Host cell Entry by *Campylobacter jejuni*. In *Campylobacter*, 3rd ed, ed. I Nachamkin, CM Szymanski, MJ Blaser, pp. 297-314. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2008.

HU, L.; BRAY, M. D.; OSORIO, M.; KOPECKO, D. J. *Campylobacter jejuni* induces maturation and cytokine production in human dendritic cells. **Infection and Immunity**, v.74, p.2697–2705, 2006.

HU, L.; KOPECKO, D.J. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. **Infection and Immunity**, v. 67, p.4171–4182, 1999.

HU, L.; TALL, B.D.; CURTIS, S.K.; KOPECKO, D.J. Enhanced Microscopic Definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 Adherence to, Invasion of, Translocation across, and Exocytosis from Polarized Human Intestinal Caco-2 Cells. **Infection and Immunity**, v.76, n.11, 2008.

HUGDAHL, M. B.; BEERY, J. T.; DOYLE, M. P. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v.56, p.1560–1566, 1988.

HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.237-57, 2007.

ISBERG, R.R.; BARNES, P. Subversion of integrins by enteropathogenic Yersinia. **Journal of Cell Science**, 2001; 114:21-28.

ISBERG, R.R. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. **Science**, 1991; 252:934-938.

JACOBS-REITSMA, W. *Campylobacter* in the food supply. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 2000. pp. 467–481.

JAIN, D.; PRASAD, K.N.; SINHA, S.; Vishwakarma, A.L. Cell cycle arrest & apoptosis of epithelial cell line by cytolethal distending toxin positive *Campylobacter jejuni*. **Indian Journal Medical Research**, April 2009, pp 418-423.

JARCHUM, I.; PAMER, E.G. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal Microbiota. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, p. 353–360, 2011.

JEON, B.; ITOH, K.; RYU, S. Promoter analysis of Citolethal Distending Toxin genes (*cdtA*, *B* and *C*) and effect of a *luxS* mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology and Immunology**, v.49, n.7, p.599-603, 2005.

JEURISSEN, S. H.; JANSE, E. M.; VAN ROOIJEN, N.; CLAASSEN, E. Inadequate anti-polysaccharide antibody responses in the chicken. **Immunobiology** v.198, p.385–395, 1998.

JIN, S.; JOE, A.; LYNATT, J.; HANI, E.K.; SHERMAN, P.; CHAN, V.L. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v.39, p.1225-1236, 2001.

JIN, S.; SONG, Y. C.; EMILI, A.; SHERMAN, P. M.; CHAN, V. L. JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90 $\alpha$  and triggers signalling pathways leading to the activation of NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase in epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v.5, p.165–174, 2003.

JOH, D., WANN, E. R.; KREIKEMEYER, B; SPEZIALE, P.; HOOK, M.. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. **Matrix Biology**, v.18, p.211-223, 1999.

JONES, B.D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialised epithelial M cells of Peyer's patches. **The Journal of Experimental Medicine**, v.180, p.15-23, 1994.

JONES, D.R.; MUSGROVE, M.T. Pathogen prevalence and microbial levels associated with restricted shell eggs. **Journal of Food Protection**, v.70, p.2004-2007, 2007.

JONES, D.R.; MUSGROVE, M.T.; CAUDILL, A.B.; CUTRIS, P.A. Frequency of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* and *Enterobacteriaceae* detection in commercially cool water-washed shell eggs. **Journal of Food Safety**, v.26, p.264-274, 2006.

JONES, M. A.; MARSTON, K.L.; WOODALL, C.A.; MASKELL, D.J.; LINTON, D.; KARLYSHEV, V.A.; DORREL, N.; WREN, B.W.; BARROW, P.A. Adaptation of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 to high-level colonization of the avian gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**. v.72, p.3769-3776, 2004.

JONKER, A.; PICARD, J.A. Antimicrobial susceptibility in thermophilic *Campylobacter* species isolated from pigs and chickens in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.81,n.4, p.228-236, 2010.

JUHAS, M.; VAN DER MEER, JR.; GAILLARD, M.; HARDING, R.M.; HOOD, D.W.; CROOK, D.W. Genomic islands: tools of bacterial horizontal transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviws**. v.33, p.376-93, 2009.

JUNG, H.C.; ECKMANN, I.; YANG, S.K.; PANJA, A.; FIERER, J.;MORZYCKA, E.; KAGNOFF, M.F. A distinct array of pro-inflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.55-65, 1995.

KAKUDA, T; DIRITA, V. J. Cj1496c encodes a *Campylobacter jejuni* glycoprotein that influences invasion of human epithelial cells and colonization of the chick gastrointestinal tract. **Infection and Immunology**, v.74, p.4715-4723, 2006.

KARLYSHEV, A. V.; CHAMPION, O.L.; CHURCHER, C.; BRISSON, J.R.; JARREL, H.C.; GILBERT, M.; BROCHU, D.; MICHAEL, F.; WAKARCHUK, W.W.; GOODHEAD, I.; SANDERS, M.; STEVENS, K.; BHITE, B.; PARKHILL, J.; WREN, B.W.; SZYMANSKI, C.M. Analysis of *Campylobacter jejuni* capsular loci reveals multiple mechanisms for the generation of structural diversity and the ability to form complex heptoses. **Molecular Microbiology**, v.55, p.90-103, 2005.

KATIAL, R.; SACHANANDANI, D.; PINNEY, C. LIEBERMAN, M. Cytokine Production in Cell Culture by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Immunocompetent Hosts. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n.1, p. 78-81, 1998.

KATIAL, R.K.; SACHANANDANI, D.; PINNEY, C.; LIEBERMAN, M.M. Cytokine Production in Cell Culture by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Immunocompetent Hosts. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, v.143, p.5-21, 1997.

KERVELLA, M.; PAGES, J.M.; PEI, Z.; GROLLIER, G.; BLASER, M.J.; FAUCHERE, J.L. Isolation and characterization of two *Campylobacter* glycine-extracted proteins that bind to HeLa cell membranes. **Infection and Immunity**, v.61, p.3440-3448, 1993.

KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, v.143, p.5-21, 1997.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternativ. Medicine. Review**, v.8, p.223-246, 2003.

KIEHLBAUCH, J. A.; ALBACH, R. A.; BAUM, L. L.; CHANG, K. P. Phagocytosis of *Campylobacter jejuni* and its intracellular survival in mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v.48, p.446-451, 1985.

KING, V.; BAVETSIA, A.; BUMSTEAD, N. Effect of host lineage on the virulence of *Campylobacter jejuni* in the chicken embryo model. **FEMS Microbiology Letters**, v.106, p.271-274, 1993.

KNUDSEN, K.N.; BANG, D.D.; ANDRESEN, L.O.; MADSEN, M. *Campylobacter jejuni* Strains of Human and Chicken Origin Are Invasive in Chickens After Oral Challenge. **Avian Diseases**, v.50, p.10-14, 2006.

KONKEL, M. E.; KLENA, J.D.; RIVERA-AMILL, V.; MONTEVILLE, M.R.; BISWAS, D.; RAPHAEL, B.; MICKELSON, J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.3296-3303, 2004.

KONKEL, M. E.; KIM, B. J.; RIVERA-AMILL, V.; GARVIS, S. G. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. **Molecular Microbiology**, v.32, p.691-701, 1999.

KONKEL, M. E.; HAYES, S.F.; JOENS. L.A.; CIEPLAK, JR. Characteristics of antigens, including flagellin, during experimental oral infections of chickens. **Avian Disease**, v.38, p.341-349, 1994.

KONKEL, M.; JOENS, L. Adhesion to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter* spp. **Infection and Immunity**, v.57, p.2984-2990, 1989.

KONKEL, M.E.; KIM, B.J.; KLENA, J.D./ YOUNG, C.R.; ZIPRIN, R. Characterization of the Thermal Stress Response of *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, p. 3666-3672, 1998.

KOROLIK, V.; ALDERTON, M.R.; SMITH, S.C.; CHANG, J.; COLOE, P.J. Isolation and molecular analysis of colonising and non-colonising strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* following experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.60, p.239-249, 1998.

KUWABARA, S.; OGAWARA, K.; MISAWA, S. et. al., "Does *Campylobacter jejuni* infection elicit "demyelinating" Guillain-Barr'e syndrome," **Neurology**, v. 63, n. 3, p. 529-533, 2004.

LAM, K.M.; DAMASSA, A.J.; MORISHITA, T.Y.; SHIVAPRASAD, H.L.; BICKFORD, A.A. Pathogenicity of *Campylobacter jejuni* for Turkeys and Chickens. **Avian Diseases**, v.36, p.359–363, 1992.

LARSON, C. L.; SHAH, D. H.; DHILLON, A. S.; CALL, D. R.; AHN, S.; HALDORSON, G. J.; DAVITT, C.; KONKEL, M. E. *Campylobacter jejuni* invade chicken LMH cells inefficiently and stimulate differential expression of the chicken CXCLi1 and CXCLi2 cytokines. **Microbiology – SGM**, v. 154, p. 3835-3847, 2008.

LEON-KEMPIS MDEL, R.; GUCCIONE, E.; MULHOLLAND, F.; WILLIAMSON, M. P.; KELLY, D. J. The *Campylobacter jejuni* PEB1a adhesin is an aspartate/glutamatebinding protein of an ABC transporter essential for microaerobic growth on dicarboxylic amino acids. **Molecular Microbiology**, v.60, p.1262–1275, 2006.

LI, S. Biopsy Diagnosis of intestinal infectious diseases. **Current diagnostic pathology**, v.6, p.206-212, 2000.

LI, Y. P.; INGMER, H.; MADSEN, M.; BANG, D. D. Cytokine responses in primary chicken embryo intestinal cells infected with *Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin and the expression of bacterial virulence-associated genes. **BMC Microbiology**, v.8, n.107, 2008.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2( $-\Delta\Delta C_T$ ) Method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.

LOUWEN, R. P.; VAN BELKUM, A.; WAGENAAR, J. A.; DOORDUYN, Y.; ACHTERBERG, R.; ENDTZ, H. P. Lack of association between the presence of the pVir plasmid and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p.1867-1868, 2006.

MACCALLUM, A. J.; HARRIS, D.; HADDOCK, G.; EVEREST, P. H. *Campylobacter jejuni*-infected human epithelial cell lines vary in their ability to secrete interleukin-8 compared to in vitro-infected primary human intestinal tissue. **Microbiology**, v.152, p.3661–3665, 2006.

MACCALLUM, A.; HADDOCK, G.; EVEREST, P. H. *Campylobacter jejuni* activates mitogen-activated protein kinases in Caco-2 cell monolayers and *in vitro*infected primary human colonic tissue. **Microbiology**, v.151, p.2765–2772, 2005.

MACCALLUM, A.; S. P. HARDY.; P. H. EVEREST. *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. **Microbiology**, v.151, p.2451-2458, 2005b.

MACKICHAN, J. K.; GAYNOR, E.C.; CHANG, C.; CAWTHRAW, S.; NEWELL, D.G.; MILLER, J.F.; FALKOW, S. The *Campylobacter jejuni* *dccRS* two-component system is required for optimal *in vivo* colonization but is dispensable for *in vitro* growth. **Molecular Microbiology**, v.54, p.1269–1286, 2004.

MANSFIELD, L. S.; BELL, J.A.; WILSON, D.L.; MURPHY, J.; ELSHEIKHAN, H.M.; RATHINAM, V.A.K.; FIERRO, B.R.; LINZ, J.E.; YOUNG, V.B. C57BL/6 and congenic

interleukin-10-deficient mice can serve as models of *Campylobacter jejuni* colonization and enteritis. **Infection and Immunity**, v.75, n. 3, p.1099–1115, 2007.

MARCHANT, J.; WREN, B.; KETLEY, J. Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. **Trends Microbiology**, v.10, p.155–159, 2002.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; FERNANDEZASTORGA, A. Detection of cdtA, cdtB, and cdtC genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, n.1, p.45-48, 2006.

LEE, Y.K.; MASMANIAN, S.K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? **Science**, v. 24, n. 330, p. 1768-1773, 2010.

MCCORMICK, B.A.; MILLER, S.I.; CARNES, D. Transepithelial signaling to neutrophils by *Salmonellae*: A nouvel virulence mechanism for gastroenteritis. **Infection and Immunology**, v.63, p.2302-2309, 1995.

MCNALLY, D. J.; JARRELL, H.C.; KHIEU, N.H.; VINOGRADOV, E.; WHITKIELD, D.M.; SZYMANSKI, C.M.; BRISSON, J.R. The HS:19 serostrain of *Campylobacter jejuni* has a hyaluronic acid-type capsular polysaccharide with a nonstoichiometric sorbose branch and *O*-methyl phosphoramidate group. **FEBS Journal**, v.273, p.3975–3989, 2006.

MEAD, G. C. Factors affecting intestinal colonisation of poultry by *Campylobacter* and role of microflora in control . **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. 2, p. 169-178, Apr./Jun. 2002.

MEINERSMANN, R. J.; RIGSBY, W. E.; STERN, N. J.; KELLEY, L. C.; HILL, J. E.; DOYLE, M. P. Comparative study of colonizing and noncolonizing *Campylobacter jejuni*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 1518-1522, 1991.

MENGAUD, J.; OHAYON, H.; GOUNON, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. **Cellular**, v.84, p.924-932, 1996.

MÉRESSE, S.; UNSWORTH, K.E.; HABERMANN, A.; GRIFFITHS, G.; FANG, F.; MARTÍNEZ-LORENZO, M.J.; WATERMAN, S.R.; GORVEL, J.P.; HOLDEN, D.W. Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. **Cellular Microbiology**, v.3, p.567–577, 2001.

MILLER, W.G.; ENGLE, M.D.; KATHARIOU, S.; WESLEY, I.V.; WANG, G. et al. Identification of host-associated alleles by multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* strains from food animals. **Microbiology**, v. 152, p. 245-255, 2006.

MONTEVILLE, M. R.; KONKEL, M. E. Fibronectinfacilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. **Infection and Immunity**, v.70, p.6665–6671, 2002.

MONTEVILLE, M. R.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outermembrane protein and microfilament reorganization. **Microbiology**, v.149, p.153–165, 2003.

MOORE, J. E.; BARTON, M. D.; BLAIR, I. S.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; KEMPF, I.; LASTOVICA, A. J.; LOWERY, C. J.; MATSUDA, M; McDOWELL, D. A.; MCMAHON, A.; MILLAR, B. C.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SEAL, B. S.; SNELLING, W. J.; TOLBA, O. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1955-1966, 2006.

MOSER, I.; W. SCHROEDER.; J. SALNIKOW. *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein and a 59-kDa protein are involved in binding to fibronectin and INT 407 cell membranes. **FEMS Microbiol Lett**, v.157, p.233-238, 1997.

MOTA, L.J.; SORG, I.; CORNELIS, G.R. Type III secretion: The bacteria-eukaryotic express. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, p.1-10, 2005.

NAIKARE, H., PALYADA, K.; PANCIERA, R.; MARLOW, D.; STINTZI, A. Major role for FeoB in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival. **Infection and Immunity**, v. 74, p.5433-5444, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: twelvth informational supplement. NCCLS M100-S12, v. 22, n. 1, Wayne, 2002.

NEWELL, D.G.; FEARNLEY, C. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.4343-4351, 2003.

NEWELL, I.; WAGENAAR, J. A.; Poultry infections and their control at the farm level. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. **Campylobacter**. 2. ed. Washington, D. C: American Society for Microbiology Press, 2000. p. 121-138.

NUIJTEN, P.J.M.; VAN ASTEN, F.J.A.M.; GAASTRA, W.; VAN DER ZEIJST, B.A.M. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* "agellin genes. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.17 798-17 804, 1990b.

NUIJTEN, P.J.M.; BARTELS, C.; BLEUMINK-PLUYM, N.M.C.; GAASTRA, W.; VAN DER ZEIJST, B.A.M. Size and physical map of the *Campylobacter jejuni* chromosome. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p.6211-6214, 1990.

OELSCHLAEGER, T.; GUERRY, P.; KOPECKO, D. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of th United States of American**, v.90, p.6884-6888, 1993.

OH, Y.K., ALPUCHE-ARANDA, C., BERTHIAUME, E., JINKS, T., MILLER, S.I., SWANSON, J.A. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. **Infective and Immunity**. v. 64,p. 3877-3883, 1996.

OWEN R.L. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells and Peyer's patches—A historical and personal perspective. **Seminars in Immunology**, v.11, p.157-163, 1999.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, n.3,p.177-188, 2002.

PARKHILL, J.; WREN, B.W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J.M.; CHURCHER, C.; BASHAM, D.; CHILLINGWORTH, T.; DAVIES, R.M.; FELTWELL, T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KARLYSHEV, A.V.; MOULE, S.; PALLEN, M.J.; PENN, C.W.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; RUTHERFORD, K.M.; VLIET, A.H.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. The genome sequence of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v.403, p.665–668, 2000.

PEI, Z. H.; ELLISON, R. T.; BLASER, M. J. Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266: p.16363-16369, 1991.

PEPE, J.; MILLER, V.L. *Yersinia enterocolitica* invasin: A primary role in the initiation of infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.6373-6377, 1993.

PICKETT, C.L. *Campylobacter* toxins and their role in pathogenesis. In: Nachamkin I, Blaser MJ, eds. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press. pp 179–190, 2000.

PIGNATARI, A.C.C. Epidemiology of *Salmonella* human infections and the relevance of integrated data in the food products chain. Anais... Memorias del Seminario Internacional sobre Salmonellosis Aviar. Rio de Janeiro, 28 a 30 de junio de 2011.

PINTO, M. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology Cell**. v. 47, p. 323-330, 1983.

REINECKER, H. C.; M. STEFFEN, C. DOEHN, J. PETERSEN, I. PFLUGER, A. VOSS, AND A. RAEDLER. Proinflammatory cytokines in intestinal mucosa. **Immunology Research**, v10, p.247–248, 1991.

RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R.; GRANUCCI, F.; KRAEHENBUHL, J.P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nature immunology**, v.2, p.361-367, 2001.

RIVERA-AMILL, V.; KIM, B. J.; SESHU, J. & KONKEL, M. E. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.1607–1616, 2001.

ROBERTS, A. B.; SPORN, M.B. 1990. The transforming growth factors- $\beta$  . In *Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide Growth Factors and Their Receptors*, ed. MBSporn, AB Roberts, pp. 419–72. New York: Springer-Verlag

ROLLINS, D.M.; COLWELL, R.R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p.531-538, 1986.

- RUIZ-PALACIOS, G. M.; ESCAMILLA, E.; TORRES, N. Experimental *Campylobacter* diarrhea in chickens. **Infection of Immunity**, v. 34, p.250–255, 1981.
- RUSSELL, R.G.; BLAKE JR.. D.C., Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **Infection and Immunity**, v.62, p.3773–3779, 1994.
- SAHIN, O.; ZHANG, Q.; MEITZLER, J.C.; HARR, B.S.; MORISHITA, T.Y.; MOHAN, R.. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.3951–3957, 2001.
- SAHIN, O.; KOBALKA, P.; ZHANG, Q. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.1070–1079, 2003.
- SANCHEZ-MUNOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, p.4280–4288, 2008.
- SANSONETTI, P.; PHALIPON, A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: Mechanisms of interaction, consequences for the disease process. **Seminars in Immunology**, v.11, p.193-203, 2009.
- ISLAM, K.M.; NEOGY, P.K.; ISLAM, M.; SPEELMAN, P.; HUQ, M.I. *Campylobacter jejuni* diarrhea model in infant chickens. **Infection and Immunity**, v.43, p.931–936, 1984.
- SARAKBI, T. *Campylobacter*: A recurrent killer of layers. Head of Veterinary Section, Marib Poultry Company, Sana'a Yemen Republic, 2002.
- SCHNEIDER, K.; KLAAS, R.; KASPERS, B.; STAHEL, P. Chicken interleukin-6 cDNA structure and biological properties. **European J. Biochemistry**, v.268, p.4200-4206, 2001.
- SESTI, L. A.; ITO, N. M. K. Enfermidades do Sistema Reprodutor. In: Berchieri Jr, A.; Macari, M. (eds). *Doença das Aves*, FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, S.P, 2000. p. 81-128.
- SHEIL, B.; J. MCCARTHY, L. O'MAHONY, M. W. BENNETT, P. RYAN, J. J. FITZGIBBON, B. KIELY, J. K. COLLINS, AND F. SHANAHAN. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. **Gut An international journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.53, p. 694–700, 2004.
- SHEPPARD, S.K.; DALLAS, J.F.; MACRAE, M.; MCCARTHY, N.D.; SPROSTON, E.L.; FORBS, K.J. *Campylobacter* genotypes from food animals, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6. **International journal of food microbiology**, v. 134, p. 96-103, 2009.
- SMITH CK, KAISER P, ROTHWELL L, HUMPHREY T, BARROW PA, JONES MA: *Campylobacter jejuni*-induced cytokine responses in avian cells. **Infection and Immunity**, v.73, p.2094-2100, 2005.

SMITH, J. L.; BAYLES, D. O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v.32, n.4, p.227-248, 2006.

SONG, Y. C.; JIN, S.; LOUIE, H.; NG, D.; LAU, R. FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. **Molecular Microbiology**, p.53, v.541-553, 2004.

STAS, T. Experimental infection of chickens with *Campylobacter jejuni*: Strains differ in their capacity to colonize the intestine. **Avian Pathology**, v.28, p.61-64, 1999.

Szymanski, C.M.; King, M.; Haardt, M.; Armstrong, G.D. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. **Infection and Immunity**, v.63, p.4295±4300, 1995.

TAKATA, T.; FUJIMOTO, S.; AMAKO, K. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. **Infection and Immunity**, v.60, p.3596±3600, 1992.

TAKEUCHI A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. **American Journal of Pathology**, v.50, p.109-136, 1996.

TAYLOR, D.E. Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 46, p. 35-64, 1992.

TRACZ, D. M.; KEELAN, M.; AHMED-BENTLEY, J.; GIBREEL, A.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; TAYLOR, D.E. pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **Emerging Infectious Disease** v.11, p.838-843, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNK, B.R.; CASE, C.L.; Mecanismos microbianos de patogenicidade. Em *Microbiologia*, 6<sup>a</sup>ed., cap. 15, p.421-438, Porto Alegre: Artmed, 2002

UNSWORTH, K.E.; WAY, M.; MCNIVEN, M.; MACHESKY, L.; HOLDEN, D.W. Analysis of the mechanisms of *Salmonella*-induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication. **Cellular Microbiology**, v.6, p.1041-1055, 2004.

VAN RHIJN, I.; BLEUMINK-PLUYM, N.M.; VAN PUTTEN, J.P; VAN DEN BERG, L.H. *Campylobacter* DNA is present in circulating myelomonocytic cells of healthy persons and in persons with Guillain-Barre syndrome. **Journal of Infectous Diseases**, v.185, p.262-265, 2002.

VANDAMME, P.; VANCANNEYT, B.; POT, B.; MELS, L.; HOSTE, B.; DEWETTINCK, D.; VLAES, L.; VAN DEN BORRE, C.; HIGGINS, R.; HOMMEZ, J. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. Nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. Nov. an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology and Evolution**, v. 42, p.344-356, 1992.

VASQUEZ-TORREZ, A.; FANG F. Cellular routes of invasion by enteropathogens. **Current Opinion Microbiology**, v.3, p.54-59, 2000.

WASSENAAR, T.M. Toxin production by *Campylobacter* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 466-476, 1997a.

- WASSENAAR, T. M.; ENGELSKIRCHEN, M.; PARK, S.; LASTOVICA, A. Differential uptake and killing potential of *Campylobacter jejuni* by human peripheral monocytes/macrophages. **Medical Microbiology Immunology**, v.186, p.139–144, 1997b.
- WASSENAAR, T.M.; FERNANDEZ-ASTORGA, A.; ALONSO, R.; MARTEINSSON, V.T.; MAGNUSSON, S.H. Comparison of *Campylobacter* fla-SVR genotypes isolated from humans and poultry in three European regions. **Letters in Applied Microbiology**, v.49, p. 388-395, 2009.
- WATSON, R. O.; GALAN, J. E. Signal transduction in *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. **Cellular Microbiology**, v.7, p.655–665, 2005.
- WATSON, R. O.; J. E. GALAN. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. **PLoS Pathogens**. v.4, p.14, 2008.
- WEINING, K.C.; SICK, C.; KASPERS, B.; STAEHELI, P. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 $\beta$ :cDNA cloning and purification of active recombinant protein. **European Journal of Biochemistry**. v. 258, p.994-1000, 1998.
- WHITEHOUSE, C. A.; BALBO, P.B.; PESCI, E.C.; COTTLE, D.L.; MIRABITO, P.M.; PICKETT, C.L. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. **Infection and Immunity**, v.66, p.1934–1940, 1998.
- WIESNER, R. S.; HENDRIXSON, D. R.; DIRITA, V. J. Natural transformation of *Campylobacter jejuni* requires components of a type II secretion system. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.5408–5418, 2003.
- WILSON, D. J.; GABRIEL, E.; LEATHERBARROW, A. J. H.; CHEESBROUGH, J.; GEE, S.; BOLTON, E.; FOX, A.; FEARNHEAD, P.; HART, C. A.; DIGGLE, P. J. Tracing the source of campylobacteriosis. **Plos Genetics**, v. 4, n. 9, 2008.
- WILSON, D. L. ET AL. Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture. **Microbiology**, v.149, p.3603–3615, 2003.
- WOOLDRIDGE, K.G.; KETLEY, J.M. *Campylobacter*±host cell interactions. **Trends in Microbiology**, v.5, p.96±102, 1997.
- WORTH, R.G.; MAYO-BOND, L.; KIM, M.; WINKEL, J.G.J.V; TODD III, R.F.; PETTY, H.R.; SCHREIBER, A.D. The cytoplasmic domain of FcyRIIA (CD32) participates in phagolysosome formation. **Blood**, v.98, n.12, p.3429-3434, 2009.
- WOSTEN, M. M.; WAGENAAR, J. A.; VAN PUTTEN, J. P. The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the *fla* regulon in *Campylobacter jejuni*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p.16214–16222, 2004.
- WUYTS, A.; PROOST, P.; LENAERTS, J.P.; BEN-BARUCH, A.; VAN, D.J.; WANG, J.M. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. **Eur J Biochem**, v.255, p.67-73, 1998.

YOUNG, C.R.; ZIPRIN, R.L.; HUME, M.E.; STANKER, L.H. Dose response and organ invasion of day-of-hatch Leghorn chicks by different isolates of *Campylobacter jejuni*. **Avian Diseases**, v.43, p.763–767, 1999.

YU, R. K.; USUKI, S.; ARIGA, T. Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain–Barre syndrome and related diseases. **Infection and Immunity**, v.74, p.6517–6527, 2006.

ZHANG, Y.; SHARMA, J.M. Immunological tolerance in chickens hatching from eggs injected with cell-associated herpesvirus of turkey (HVT). **Developmental & Comparative Immunology**, v.27, p.431–438, 2003.

ZHENG, J.; MENG, J. H.; ZHAO, S. H.; SINGH, R.; SONG, W. X. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 768–774, 2006.

ZHENG, J.; MENG, J.; ZHAO, S.; SINGH, R.; SONG, W. *Campylobacter*-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires *Campylobacter*-secreted cytolethal distending toxin- and toll-like receptor-mediated activation of NF- $\kappa$ B. **Infection and immunity**, v. 76, n° 10, 4498 – 4508, 2008.

ZIPRIN, R. L.; YOUNG, C.R.; BYRD, J.A.; STANKER, L.H.; HUME, M.E.; GRAY, S.A.; KIM, B.J.; KONKEL, M.E. Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Disease**, v.45, p.549–557, 2001.