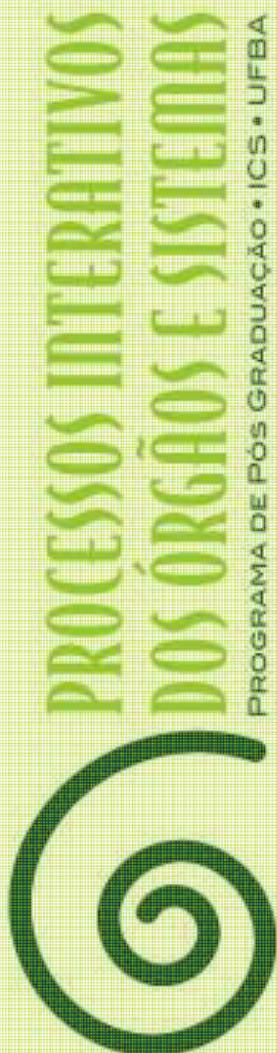


UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

Igor Farias Tavares



**ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS
BALB/c INFECTADOS COM DUAS LINHAGENS DE
*CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS***

Salvador
2012

Igor Farias Tavares

**ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS *BALB/c* INFECTADOS
COM DUAS LINHAGENS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer
Co orientador: Prof. Dr. Ricardo Fraga

SALVADOR – BA

2012

Ficha catalográfica

Ata da Sessão Pública

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre estar iluminando os meus caminhos.

Aos Meus pais que sempre estão ao meu lado e me apoiando em todas as decisões, tendo uma participação fundamental na realização dos meus objetivos.

Ao professor Roberto Meyer pela orientação e por ter me recebido no laboratório para a realização desta dissertação.

Ao professor Ricardo Fraga pela co-orientação e paciência.

À professora Soraya Trindade pelo auxílio na análise estatística deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação pela competência na administração dos trabalhos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação que contribuíram bastante para o meu aprendizado.

Aos colegas do Labimuno pelo incentivo e companheirismo, Milton, Heidy, Marcos, Taty, Ítala, Adriano, Tais, Andreia, Rejane.

Aos Funcionários e Professores do Labimuno.

A CAPES pelo financiamento dos meus estudos.

“Quando a gente acha que tem todas as respostas vem à vida e muda todas as Perguntas...”

Luis Fernando Veríssimo

RESUMO

A linfadenite caseosa, causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C.p*) é considerada uma doença crônica que acomete caprinos e ovinos, causando perdas econômicas graves no Nordeste do Brasil. Neste trabalho buscou-se avaliar aspectos da resposta imunológica de camundongos *BALB/c* durante a infecção com duas diferentes linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (T1 e C57) que apresentam graus de virulência diferentes: a cepa T1 caracteriza-se por apresentar infecções mais brandas, ao passo que a C57 um comprometimento maior dos animais infectados. A infecção experimental de camundongos reproduz os principais aspectos observados em caprinos e ovinos. Para este experimento foram utilizados 15 camundongos da linhagem *BALB/c* subdivididos em três grupos: grupo controle (n=5), grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem T1(n=5) e um grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem C57(n=5). Após 70 dias de infecção esses animais foram eutanasiados. Realizou-se também a avaliação morfológica (presença de granulomas e peso do baço). A resposta imune inata foi avaliada através do padrão de migração celular para a cavidade peritoneal, através da quantificação total e diferencial de células presentes nesta cavidade. A avaliação da resposta imune adaptativa foi realizada através da mensuração da população de linfócitos TCD4+ e TCD8+ presentes no baço de cada camundongo *BALB/c*, através da imunofenotipagem por citometria de fluxo, bem como a mensuração das citocinas IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, INF- γ e TNF- α no homogenato do baço. A linhagem C57 induziu alterações morfológicas (presença de granulomas e peso do baço) mais acentuadas, que a linhagem T1. Foi possível também identificar que durante a infecção com a linhagem C57 ocorreu um maior direcionamento celular para o local da infecção e um aumento dos linfócitos TCD4+ e TCD8+. Observou-se também que as citocinas do perfil inflamatório IL-1 alfa e IL-6 e regulatório IL-13 e IL-10 apresentaram diferença significativa, demonstrando um aumento no grupo dos animais infectados com a linhagem T1. As citocinas TNF- α e IL-17 são difíceis de serem padronizadas, uma vez que não foi observado a produção detectável destas citocinas. As citocinas IL-2, IL-4, INF- γ , IL-22, IL-21 e IL-27 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Pode-se concluir que diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57) podem apresentar graus de virulência diferentes, que por sua vez, podem interferir no processo de estabelecimento da doença. Os resultados encontrados contribuem para uma melhor compreensão do tipo de resposta e dos mecanismos imunológicos envolvidos durante a infecção com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-chaves: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Camundongo *BALB/c*, Resposta imune.

FARIAS TAVARES, Igor. **Aspects of the immune response of BALB/c mice infected with two strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 83f., il. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

ABSTRACT

Caseous lymphadenitis, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C.p*) is considered a chronic disease of caprines and ovines which causes important economic losses in the northeast region of Brazil. In the present work, we evaluated some aspects of BALB/c mice immunological response during infection with two strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (T1 and C57) which present different degrees of virulence: T1 strain presents milder infection characteristics and C57 strain causes a wilder infection. Mice experimental infection resembles the main aspects of caprine and ovine infection. Fifteen BALB/mice were used and assigned in three groups: Control group (n=5), T1 strain infected group - 10^4 cfu/ml (n=5) and C57 strain infected group - 10^4 cfu/ml (n=5). Seventy days post-infection, animals were euthanized and a morphological evaluation (granuloma detection and spleen weight) was performed. Innate immune response was evaluated by total and differential quantification of cell migration to the peritoneal cavity. Acquired immune response profile was performed by measurement of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocyte populations on BALB/c mice spleens by flow cytometry as well as cytokines (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, INF- γ e TNF- α) on spleen homogenates. C57 strain induced a higher rate of morphological alterations (granuloma formation and spleen weight enlargement) than T1 strain. It was also possible to identify a more prominent cell migration and a incremental tendency of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes to the infection site during C57 infection. It was also observed that inflammatory, IL-1 α and IL-6, and regulatory, IL-3 and IL-10, cytokines presented significant differences, showing an incremental tendency in the T1 strain-infected animals group. The TNF- α and IL-17 cytokines are difficult to be standardized, and herein they were not detectable. IL-2, IL-4, INF- γ , IL-21, IL-22 and IL-27 cytokines did not present any significant differences among the studied groups. It is possible to conclude that different strains of *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57) will present variable degrees of virulence, which, in turn, may interfere in the establishment of the disease. The results found herein contributed for a better understanding of the immunological response and mechanistics associated to the diverse infection patterns of different *C. pseudotuberculosis* strains.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, BALB/c mice, immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Lesão de LC no linfonodo parotídeo de caprino.....	22
Figura 2 – Pulmão com múltiplas lesões caseosas de LC.....	23
Figura 3 – Esquema da estrutura de um granuloma.....	24
Figura 4 – Esquema da evolução da patogenia da LC.....	25
Figura 5 – Camundongo <i>BALB/c</i>	36
Figura 6 – Pesagem do camundongo.....	37
Figura 7 – Baço retirado do camundongo.....	38
Figura 8 – Maceração do baço- obtenção de células esplênicas.....	38
Figura 9 – Lavado peritoneal com salina.....	38
Figura 10- Volume recuperado da cavidade peritoneal.....	38
Figura 11- Aparelho cytopspin.....	39
Figura 12- Camundongo <i>BALB/c</i> com granuloma.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Determinação do peso do baço de camundongo BALB/c infectado experimentalmente com 10^4 /ml por duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57).....44
- Gráfico 2 – Quantidade total de células do lavado peritoneal de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção por duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57).....45
- Gráfico 3 – Determinação da contagem diferencial de células de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção por duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57).....47
- Gráfico 4 – Determinação da Média de Intensidade de Fluorescência (MIF) de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção por duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57).....48
- Gráfico 5 – Produção de IL-2 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção por duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57).....49
- Gráfico 6- Produção de IL-1 α por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57).....50
- Gráfico 7- Produção de IL-4 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (T1 e C57).....50

Gráfico 8- Produção de IL-5 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i> (T1 e C57).....	51
Gráfico 9- Produção de IL-6 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i> (T1 e C57).....	52
Gráfico 10- Produção de IL-13 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i> (T1 e C57).....	53
Gráfico 11- Produção de INF- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i> (T1 e C57).....	54
Gráfico 12- Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i> (T1 e C57).....	55
Gráfico 13- Produção de IL-22 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i> (T1 e C57).....	55
Gráfico 14- Produção de IL-21 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i> (T1 e C57).....	56
Gráfico 15- Produção de IL-27 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção com duas diferentes linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i> (T1 e C57).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns genes de <i>C.pseudotuberculosis</i> depositados no GenPet, National Center for Biotechnology (NCBI).....	20
Tabela 2 –Cronologia da incidência dos granulomas ao longo de 70 dias após a infecção experimental em camundongos.....	42
Tabela 3 – Distribuição dos granulomas de acordo com as regiões anatômicas em camundongos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

API Coryne-	“Kit” para identificação bioquímica de bactérias
BHI	Infusão de cérebro e coração
ELISA	Ensaio imunoenzimático (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	Interferon gama
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
LC	Linfadenite caseosa
NO	Óxido nítrico
PBS – T20	Salina Tamponada com Fosfato (“Phosphate-Buffered Saline”) Tween-20
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
kDa	Kilo Dalton (1000 daltons)
SPSS	Programa estatístico
TCD4⁺	Linfócito ou célula TCD4 ⁺
TCD8⁺	Linfócito ou célula TCD8 ⁺
Th1	Células T “helper” tipo 1
Th2	Células T “helper” tipo 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral – alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1.	LINFADENITE CASEOSA.....	16
2.1.1.	Histórico e taxonomia	16
2.1.2.	Aspectos microbiológicos	17
2.1.3.	Aspectos moleculares e fatores de virulência	18
2.1.4.	Aspectos da patogênese e Transmissão	22
2.1.5.	Prevalência e importância econômica	25
2.1.6.	Resposta Imune	26
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5	HIPÓTESE	33
6	MATERIAIS E MÉTODOS	34
6.1	Delineamento experimental.....	34
6.2	Linhagens de <i>C.pseudotuberculosis</i>	35
6.3	Preparo do inóculo.....	35
6.4	Animais.....	36
6.5	Padrão de migração celular.....	38
6.6	Avaliação da resposta imune celular	40
6.6.1	Imunofenotipagem (citometria de fluxo).....	40

6.6.2	Produção de citocinas (citometria de fluxo).....	40
6.6.3	Análise Estatística.....	41
7	RESULTADOS.....	42
8	DISCUSSÃO.....	58
9	CONCLUSÕES.....	66
10	REFERÊNCIAS.....	68
11	ANEXOS.....	xx

1. INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura é uma atividade de grande importância para o desenvolvimento socioeconômico do semiárido brasileiro, pois o agronegócio de caprinos e ovinos no país está criando novas possibilidades comerciais e industriais, promovendo, assim, o desenvolvimento da região (ALVES e PINHEIRO, 2005). Um dos fatores limitantes desta atividade é a utilização de manejos inadequados desses pequenos ruminantes e, também, a ocorrência de doenças contagiosas como a linfadenite caseosa (LC). Esta é considerada uma doença crônica debilitante de ocorrência no mundo inteiro, que acomete caprinos e ovinos, causada pela bactéria intracelular *Corynebacterium pseudotuberculosis* (ALVES, PINHEIRO e SANTIAGO, 2007).

A infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos resulta na formação de lesões piogranulomatosas que podem apresentar-se em duas principais formas: a externa, também conhecida como cutânea ou superficial e a interna também chamada de visceral (BAIRD & FONTAINE, 2008). A transmissão acontece através de ferimentos na pele, por contato direto com as secreções dos granulomas ou pela aspiração de aerossóis (ALVES *et al.*, 2007; RADOSTITS *et al.*, 2007; RIET-CORREA, 2007).

Por ser uma doença de extensão global a LC pode ser identificada em países da Europa, Austrália, América do Norte e do Sul, África e Oriente Médio (BAIRD e FONTAINE, 2007). No Brasil, em especial na região nordeste, a incidência de animais com sinais clínicos pode chegar a 50% do rebanho (ALVES *et al.*, 2008).

A LC no estado da Bahia [que corresponde ao maior rebanho de caprinos do Brasil (BRASIL, 2010)] é a responsável por grandes perdas econômicas, principalmente, para os pequenos produtores que tem na caprinocultura a essencial fonte de renda familiar (RIBEIRO *et al.*, 1988; MOURA-COSTA, 2002; MEYER, 2004; DORELLA *et al.*, 2006a). Esta patologia é a responsável por comprometimento do couro, além de poder ocasionar perda de peso, desordens reprodutivas (como abortos e mortalidades neonatais), diminuição da produção de carne e lã, condenação da carne (NAIR; ROBERTSON, 1974; AYERS, 1977; ASHFAQ; CAMPBELL, 1979; BURREL, 1981; EGGLETON *et al.*, 1991; ALONSO *et*

al., 1992) e diminuição da produção de leite, em virtude da alta prevalência de granulomas mamários (BURRELL, 1981).

A imunidade estabelecida a esta bactéria intracelular facultativa é complexa e envolve tanto mecanismos da resposta imune inata, quanto adaptativa. Na resposta imune inata os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas no início da infecção. A presença destes tipos celulares pode ser crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e também secundária à LC (JOLLY, 1965a; HARD, 1969; LAN *et al.*, 1999), uma vez que são responsáveis pela fagocitose e destruição dos microrganismos (NORTH, 1978). Entretanto, bactérias intracelulares patogênicas, sendo resistentes à degradação dentro dos fagócitos, principalmente por alterar a produção de óxido nítrico destas células, tendem a causar infecções crônicas, difíceis de serem erradicadas (TASHJIAN e CAMPBELL, 1983). Desta forma, torna-se importante o auxílio da resposta imune adaptativa que favoreça a ação da fagocitose para eliminar/conter o microrganismo, como por exemplo, *C. pseudotuberculosis*. Desse modo, um envolvimento das células T CD4⁺, subpopulação Th1, torna-se uma importante ferramenta (JOLLY, 1995b; LAN *et al.*, 1998).

O controle deste agravo deve estar apoiado em medidas que possam inibir a entrada/disseminação de *C. pseudotuberculosis* no rebanho, sendo assim, a imunoprofilaxia, baseada no estabelecimento de vacinas, é uma importante ferramenta frente à LC (PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998; PATON *et al.*, 2003; DORELLA *et al.*, 2006a).

Neste trabalho buscou-se avaliar aspectos da resposta imunológica de camundongos *BALB/c* durante a infecção com duas linhagens de *pseudotuberculosis* (T1 e C57) que apresentam graus de virulência diferentes. A linhagem T1 caracteriza-se por apresentar infecções mais brandas. Essa linhagem foi considerada naturalmente atenuada por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa que os demais isolados selvagens (DORELLA *et al.*, 2006; MOURA-COSTA *et al.*, 2008). Ao passo que a linhagem C57 leva a um maior comprometimento nos animais por ela infectados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. LINFADENITE CASEOSA

2.1.1 Histórico e taxonomia

Em 1888, o bacteriologista francês Edward Nocard isolou um organismo não usual proveniente de um caso de linfagite em uma vaca (NOCARD, 1896). Três anos mais tarde, o bacteriologista búlgaro Hugo Von Preiz identificou uma bactéria similar em cultura de um abscesso renal de uma ovelha (PREISZ e GUINARD, 1891). Como consequência desta pesquisa, o organismo em questão tornou-se conhecido como bacilo “Preisz- Nocard”.

No final do século XIX a bactéria foi descrita pelos bacteriologistas alemães Lehmann e Neumann na primeira edição do atlas bacteriológico (LEHMANN e NEUMANN, 1896). Naquela publicação, o bacilo Preisz-Nocard foi renomeado *Bacillus pseudotuberculosis* uma derivação do grego *pseudos tuberculosis* ou “falsa tuberculose” e uma referência para a suposta similaridade clínica das lesões para os nódulos caseosos de tuberculose microbacteriana.

Na primeira edição de Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology*, publicada em 1923, o organismo foi localizado no *Corynebacterium diphtheriae* genus, que foi originalmente criado por uma categoria patogênica humana *Corynebacterium diphtheriae*. Esta edição do *Manual* refere-se ao trabalho demonstrando que *B. pseudotuberculosis* parece com *C. diphtheriae* na morfologia e na composição da parede celular, levando a uma distante mudança do nome para *Corynebacterium ovis*. Subsequentemente, o organismo foi isolado proveniente de infecções purulentas e linfagites ulcerativas em outras espécies de mamíferos incluindo caprinos, cavalos e seres humanos. Em reconhecimento disto, quando a sexta edição do *Manual* de Bergey foi publicado em 1948, o nome da espécie mudou novamente de *ovis* para a designação inicial de *pseudotuberculosis* (EUZEBY, 2005).

Corynebacterium pseudotuberculosis é um membro do grupo CMN que inclui *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia* formando espécies de interesse médica, veterinária e biotecnológica (BASTOS *et al.*, 2012). Apesar de ser um grupo bastante heterogêneo, essas espécies compartilham algumas características em comum como a organização da parede celular que é principalmente composta de

peptidoglicano, arabinogalactano e os ácidos micólicos, bem como um alto conteúdo de guanina-citosina (G+C) presentes no genoma (BAIRD; FONTAINE, 2007; PUECH, 2001; BAYAN *et al.*, 2003).

2.1.2 Aspectos microbiológicos

C. pseudotuberculosis caracteriza-se como um bacilo Gram-positivo imóvel, curto e irregular, medindo 0,5 a 0,6 µm de diâmetro por 1 a 3 µm de comprimento. Pode apresentar aspecto cocóide e se mostrar isolado ou formando grupamentos irregulares ou em paliçadas. É um organismo intracelular facultativo, fermentativo, anaeróbio facultativo e não formador de esporos, além de ser mesófilico, com temperatura ideal de crescimento de 37°C em pH ideal entre 7,0 e 7,2 (DORELLA *et al.*, 2006).

Quanto às reações bioquímicas, *C. pseudotuberculosis* caracteriza-se por apresentar uma grande capacidade fermentativa, sendo capaz de utilizar para tal propriedade, uma variada fonte de carboidratos como glicose, frutose, manose, maltose e sacarose, com produção de ácidos, porém sem produzir gás, não apresenta atividade proteolítica, não tem habilidade para hidrolisar a gelatina ou digerir caseína, sendo também oxidase negativa. Em relação à redução de nitrato é bastante variável (DORELLA *et al.*, 2006).

Do ponto de vista nutricional *C. pseudotuberculosis* cresce muito bem em meios suplementados com soro animal ou enriquecido com o ágar-sangue, Agar-BHI (infusão cérebro-coração) ou caldo BHI sendo que este meio é melhorado quando é adicionado extrato de levedura, triptona ou lactalbumina (BASTOS *et al.*, 2012). No ágar-sangue ocorre a formação de pequenas colônias, de cor branco-acinzentada, opacas e friáveis, após um período de 24 a 48 horas (MOURA-COSTA, 2002).

C. pseudotuberculosis possui dois biótipos ou biovares denominados *ovis* e *equi*, que são classicamente definidos pela sua capacidade de produzir a enzima nitrato-redutase, que permite a conversão do nitrato para nitrito em provas bioquímicas (MOTTA; CREMASCO; RIBEIRO, 2010). O biotipo *equi* possui capacidade de reduzir o nitrato a nitrito, enquanto o biotipo *ovis* não reduz este substrato (MOURA-COSTA, 2002). O biotipo *equi* infecta preferencialmente os

equinos, enquanto o biotipo *ovis* acomete os pequenos ruminantes (MOURA-COSTA, 2002).

C. pseudotuberculosis é bastante resistente às condições ambientais. Por exemplo, no frio e em ambientes úmidos, esse organismo pode permanecer por seis meses ou mais, e no solo experimentalmente contaminado com pus, pode permanecer viável por 8 meses. O bacilo pode também ser resistente a alguns desinfetantes químicos, como hipoclorito e solução de cresol ou formalina (BAIRD; FONTAINE, 2007; ANDERSON, RINGS e PUCH, 2005). Mostra-se sensível a vários antibióticos, a exemplo da ampicilina, do clorafenicol, da lincomicina, da tetraciclina, da gentamicina e da penicilina (ABREU *et al.*, 2008).

2.1.3 ASPECTOS MOLECULARES E FATORES DE VIRULÊNCIA

O seqüenciamento genômico de várias linhagens de *C. pseudotuberculosis*, isoladas de diferentes hospedeiros, já começa a contribuir para uma melhor compreensão da relação parasita-hospedeiro, bem como para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos e novas estratégias de prevenção e tratamento. Um dos primeiros seqüenciamentos completos do genoma completo de *C. pseudotuberculosis* foi o da cepa P54B96, isolada de um antílope na África do Sul. Assim, o seu genoma foi depositado e se encontra disponível no Genbank (CP003385.1). O seqüenciamento, a finalização e as anotações foram realizados pela rede Paraense de Genômica e Proteômica (RPGP), Pará, Brasil (SILVA *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2012).

Embora haja uma crescente demanda de resoluções para a LC, pouco se investigou sobre os mecanismos moleculares da virulência em *C. pseudotuberculosis*. Nos últimos 20 anos, dois determinantes da virulência foram bem caracterizados: a exotoxina fosfolipase D (PLD) e os lipídeos tóxicos da parede celular, também denominados de ácidos corinomicólicos. A PLD é considerada como o principal fator de virulência desta bactéria (LIPSKY *et al.*, 1982; HODGSON *et al.*, 1999), constituindo um fator de permeabilidade que promove a hidrólise de ligações éster na esfingomielina da membrana de células de mamíferos (CARNE e ONON, 1978; COYLE e LIPSKY, 1990; McNAMARA *et al.*, 1995); dessa forma, esta exotoxina contribui para a dispersão do microrganismo do sítio inicial de infecção

para sítios secundários dentro do hospedeiro (HODGSON *et al.*, 1992; WILLIAMSON, 2001). Por outro lado, os ácidos corinomicólicos são lipídeos de superfície de *C. pseudotuberculosis* que contribuem para a patogênese da doença (HARD, 1972), de forma que linhagens mais virulentas possuem mais lipídeos que as linhagens atenuadas (JOLLY, 1966). Esta camada lipídica representa uma proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos de macrófagos, além de permitir a aderência dos microrganismos e promover uma citotoxicidade local (MUCKLE & GYLES, 1982; ALVES *et al.*, 1997).

Após o completo sequenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*, estudos *in silico* demonstraram a associação de alguns genes com possíveis mecanismos de virulência do microrganismo; os genes já caracterizados encontram-se dispostos na tabela 1 (D'AFONSECA *et al.*, 2008), os quais estão atualmente depositados no GenPept (National Center for Biotechnology Information – NCBI). Dentre estes genes, foram registrados quatro genes (*fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD*) que compõe o *operon fag ABC*, o qual é responsável pela expressão de proteínas envolvidas na captação de ferro (transportador ABC) que contribuem para a persistência bacteriana em modelo de infecção caprina. Estes genes são regulados pela disponibilidade de ferro do ambiente, sendo melhor expressos em condições de restrição de elemento químico (BILLINGTON *et al.*, 2002). Este sofisticado mecanismo foi amplamente descrito em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo possível encontrar diversos trabalhos publicados sobre as bases moleculares da captação de ferro, e as moléculas envolvidas são comumente denominadas de sideróforos (HEINRICHS *et al.*, 1999 ; BROWN *et al.*, 2001a,b).

Tabela 1. Alguns genes de *C. pseudotuberculosis* depositados no GenPept, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (D'Afonseca *et al.*, 2008).

Accession number (GenPept)	Putative protein	Reference
ABI29892	10-kDa chaperonin GroES	Coelho KS and Azevedo V (unpublished results)
AAV48830	60-kDa chaperonin 1	Estevam E, Miyoshi A and Azevedo V (unpublished results)
ABI75067	65-kDa heat shock protein	Flandrois J-P and Fardel G (unpublished results)
AAB71614	AroB (3-dehydroquinase synthase)	Simmons <i>et al.</i> , 1997
AAB71615	AroB (3-dehydroquinase)	Simmons <i>et al.</i> , 1997
P96749	AroB (3-dehydroquinase synthase)	Simmons <i>et al.</i> , 1997
P96750	AroQ (3-dehydroquinase dehydratase)	Simmons <i>et al.</i> , 1997
AAL79811	FagA (integral membrane protein)	Billington <i>et al.</i> , 2002
AAL79810	FagB (iron-enterobactin transporter)	Billington <i>et al.</i> , 2002
AAL79809	FagC (ATP-binding cytoplasmic membrane protein)	Billington <i>et al.</i> , 2002
AAL79812	FagD (iron-siderophore binding protein)	Billington <i>et al.</i> , 2002
P20626	Phospholipase D precursor	Hodgson <i>et al.</i> , 1990
AAA64910	Phospholipase D	Cuevas and Songer, 1993
AAA99867	Phospholipase D	McNamara <i>et al.</i> , 1994
CAA01541	Phospholipase D	–
AAA82608	Protein recA	Pogson <i>et al.</i> , 1996
P48288	Protein recA	Pogson <i>et al.</i> , 1996
AAS89201	RpoB (RNA polymerase β subunit)	Khamis <i>et al.</i> , 2004
AAA67924	Serine proteinase precursor	Wilson <i>et al.</i> , 1995

No que se refere ao ferro como nutriente para microrganismos, diversas pesquisas já demonstraram que este metal é uma molécula fundamental para o metabolismo e crescimento bacteriano, participando de processos celulares vitais, de modo que a sua aquisição por um microrganismo constitui um dos fatores de maior importância para a sua sobrevivência no ambiente durante a infecção do hospedeiro (BROWN e HOLDEN, 2002). Por outro lado, humanos e animais desenvolveram mecanismos de defesa naturais associados à retenção do ferro corporal, os quais são desenvolvidos por proteínas como a transferrina, ferritina e lactoferrina; o sequestro do ferro por estas moléculas o indisponibiliza para e captação por microrganismos, o que contribui para a redução da proliferação bacteriana após o início da infecção (BULLEN *et al.*, 2005).

Partindo do princípio que o ambiente de infecção do hospedeiro apresenta naturalmente uma baixa disponibilidade de ferro, pesquisadores passaram a buscar uma mimetização dessas condições em modelos *in vitro*, de forma que os microrganismos expressassem os possíveis fatores de virulência que são realmente expressos *in vivo*. A restrição do ferro para microrganismos em meios de cultura foi alcançada pela suplementação com agentes quelantes, como mesitato de deferroxamina, deferiprona e deferasirox (MAURER *et al.*, 2007 ; PARADKAR *et al.*, 2008) ; outros estudos buscaram tal mimetismo realizando o cultivo bacteriano diretamente em soro humano e animal ou em soro fetal bovino industrial, os quais

são ambientes naturalmente ricos em proteínas quelantes de ferro (OOGAI *et al.*, 2011).

Dentre os avanços científicos gerados nessa área, pesquisas recentes já registraram a existência de genes e fatores de virulência regulados pela disponibilidade de ferro, de forma que o perfil de expressão gênica e o proteoma bacterianos são alterados como resposta à restrição férrica. A partir destas modificações, novos fatores de virulência associados ao metabolismo do ferro, patogênese bacteriana e persistência do patógeno no hospedeiro foram descobertos em *Corynebacterium diphtheriae* (SCHMITT, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (CRONJÉ *et al.*, 2005; RODRIGUEZ & SMITH, 2006), *Mycobacterium avium* (JANAGAMA *et al.*, 2010), *Rhodococcus equi* (BOLAND & MEIJER, 2000; BARGEN *et al.*, 2011), *Francisella tularensis* (LENCO *et al.*, 2006) e *Chlamydophila pneumoniae* (MAURER *et al.*, 2007), dentre outros microrganismos intracelulares.

Considerando a demanda mundial de soluções para a linfadenite caseosa dos caprinos e ovinos e a escassez de conhecimento sobre os fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis*, faz-se necessária a realização de estudos voltados para compreensão dos mecanismos de patogênese do microrganismo e suas moléculas associadas. Nesse sentido, ensaios *in vitro* de crescimento de *C. pseudotuberculosis* sob condições de restrição de ferro podem contribuir para a expressão de um novo perfil de fatores de virulência, de forma que moléculas fundamentais à patogênese e ainda desconhecidas possam ser identificadas e caracterizadas e, posteriormente, utilizadas na elaboração de novos modelos vacinais (HONMA *et al.*, 2011).

Outros fatores de virulência estão sendo identificados e as suas expressões em diferentes condições experimentais estão sendo avaliadas. Dentre estes podem ser citados a enzima sialidase (nanH), de ação conhecida em várias outras bactérias, como responsável por romper resíduos de ácido siálico de glicoproteínas da superfície de células do hospedeiro, assim facilitando colonizações microbianas (HONMA *et al.*, 2011); a enzima superóxido dismutase C (sodC), responsável pela inativação de radicais reativos de oxigênio exógenos e tóxicos para diversos microrganismos (KEITH and VALVANO, 2007); a enzima CP40, uma serino-protease com ação protetora para este microrganismo (WILSON *et al.*, 1995); uma pilina (spaC), de localização na extremidade do pelo bacteriano e importante na adesão à superfície celular hospedeira (GASPAR and TON-THAT, 2005); e a proteína-cinase

G (PKnG), que em outros microrganismos assemelhados, como em *Mycobacterium tuberculosis*, desempenha importante mecanismo no escape deste bacilo à fagocitose, bloqueando a fusão de lisossomos ao fagossomo (WALBURGER, A. *et al.*, 2004).

2.1.4 Aspectos da patogênese e transmissão

Nas infecções naturais dos pequenos ruminantes, a bactéria utiliza como a principal porta de entrada ferimentos ou pequenas abrasões na superfície da pele (DORELLA *et al.*, 2006a; BAIRD; FONTAINE, 2007). Após a entrada ocorre a formação de pequenas lesões granulomatosas geralmente no local de acesso, comumente a região subcutânea, ou nos linfonodos superficiais, originando a LC externa ou superficial (SMITH; SHERMAN, 1994; KURIA *et al.*, 2001; BAIRD; FONTAINE, 2007; SOARES, VIANA; LEMOS, 2007). Essa lesão leva a perda de pelo nos animais e resulta na ruptura dos abscessos provocando a liberação do pus (Fig.1).

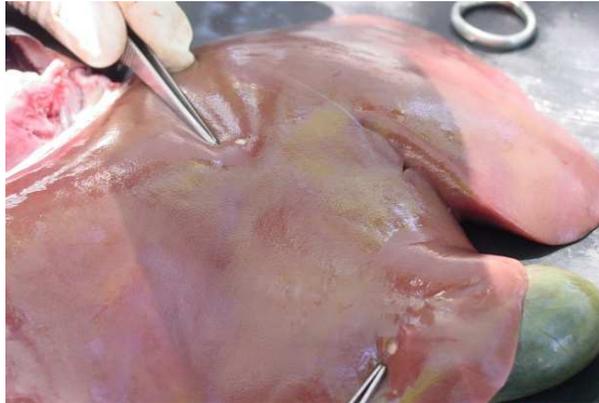
Figura 1- Lesão de LC no linfonodo paratídeo de caprino.



Fonte: FEHLBERG, 2010

À medida que o microrganismo se dissemina, utilizando a via linfática ou sanguínea, as lesões se desenvolvem em órgãos internos, comumente nos linfonodos mediastínicos ou nos pulmões. Entretanto, qualquer órgão pode ser acometido. Esta forma é conhecida como LC visceral, sendo observada com mais frequência em ovinos que nos caprinos (PEKELDER, 2000; KURIA *et al.*, 2001; BAIRD; FONTAINE, 2007) (Fig.2).

Figura 2- Pulmão com múltiplas lesões caseosas de LC

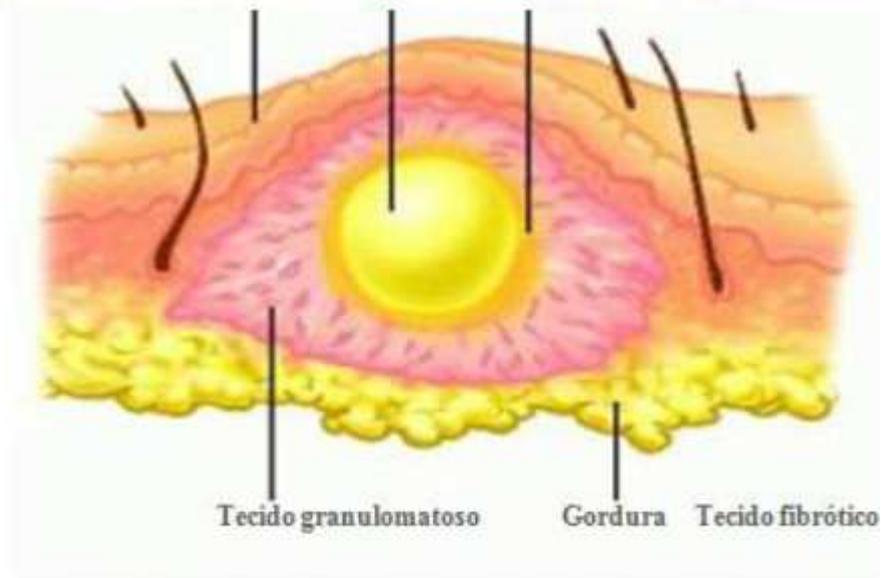


Fonte: MEYER, 2004

As duas formas de manifestações clínicas podem ou não coexistir em um mesmo animal e o período de incubação é de aproximadamente 2 a 6 meses, o que torna a doença clinicamente detectável em animais mais velhos (PEKELDER, 2000; WILLIAMSON, 2001).

O granuloma formado por *C.pseudotuberculosis* é constituído por um centro necrótico contendo pus de cor verde claro a amarelo, cercado por camadas concêntricas de células do sistema imune (macrófagos e principalmente linfócitos) delimitados por uma cápsula de tecido conjuntivo (Fig.3). A consistência do pus evolui de líquida, no início da formação do granuloma, a pastosa, chegando a caseosa nas lesões antigas (PEPIN *et al*; 1994).

Figura 3 - Esquema da estruturação de um granuloma.



Modificado de <http://img.tfd.com/dorland/thumbs/abscess.jpg>

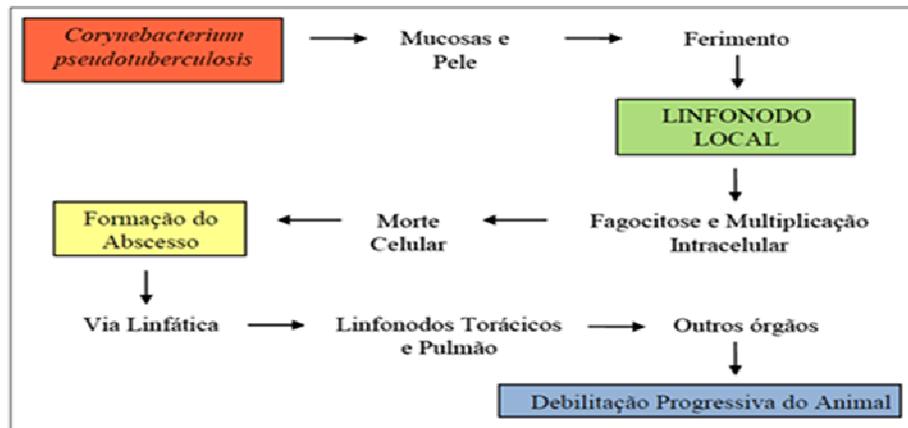
O piogranuloma na linfadenite caseosa consiste em um mecanismo de defesa, que limita a disseminação bacteriana sistêmica (PEKELDER, 2000). Em alguns animais a infecção pode se disseminar por via linfática e hematogênica para os pulmões e outras partes do organismo sem envolver o linfonodo próximo da porta de entrada (COLLETT, BATH, CAMERON, 1994). Os abscessos pulmonares podem eventualmente romper e contaminar o meio ambiente (WILLIAMSON, 2001).

A transmissão ocorre por meio da pele ou ferimentos na membrana mucosa, seguida pela disseminação da bactéria para os linfonodos superficiais, que constituem a fonte primária de infecção da LC e que, por conseguinte se abscedam e se rompem, bem como nas secreções nasal e bucal dos animais com abscessos pulmonares e que drenam para a árvore brônquica (RADOSTITS *et al.*, 2002). Radostits *et al.*, (2002) sugeriram que ferimentos na pele de caprinos ocorre devido a pequenas vegetações que possuem espinhos, sendo que estas estão localizadas na região de caatinga do nordeste brasileiro.

Após penetrar nos ferimentos da pele ou mucosa danificada *C. pseudotuberculosis* migra para os linfonodos locais e com isso o processo de infecção evolui com a fagocitose, multiplicação da bactéria, desintegração e morte celular desencadeando a formação do granuloma. Geralmente o acometimento dos linfonodos torácicos, pulmões e de outros órgãos ocorre através da via linfática

causando por fim a debilitação progressiva do animal (Fig.4) (ALVES, PINHEIRO e SANTIAGO 2007).

Figura 4. Esquema da evolução da patogenia da LC



Fonte: Alves *et al* (1997), adaptado de Batey (1986)

2.1.5 Prevalência e importância econômica

LC é uma doença de importância mundial em decorrência da alta prevalência trazendo prejuízos econômicos aos criadores de ovinos e caprinos em todo o mundo. Entre os prejuízos destaca-se: redução na produção da carne e leite, depreciação da lã, retardo no desenvolvimento dos animais, gastos com tratamento e honorários veterinários, deficiências nos índices reprodutivos do rebanho, condenação de carcaças, descarte precoce e morte ocasional de animais (MOTTA, CREMASCO e RIBEIRO, 2010).

Esta enfermidade ocorre em países que apresentam uma significativa população de caprinos e ovinos como: Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, França, Itália, Argentina, Chile, Uruguai, Venezuela, Turquia, Cuba e Brasil (ARSENAULT *et al.*, 2003; CABRERA *et al.*, 2003; CHIRINOZARRAGA *et al.*, 2005; DORELLA *et al.*, 2006). Recentemente foi relatado também na Dinamarca (MOLLER *et al.*, 2000).

No Brasil a LC ocorre em várias regiões, como por exemplo, no Rio de Janeiro foi estimada a prevalência de 12,2% em ovinos assintomáticos, e 32,5% com animais com sinais de LC. Na região sul do país foi descrita a ocorrência de 8,09% de LC em ovinos, mas é principalmente na região nordeste, a qual detém

91,4 % do rebanho caprino brasileiro (BRASIL, 2007; MOTTA, CREMASCO e RIBEIRO, 2010), que a sua alta prevalência (30 a 50 %) é preocupante (COSTA *et al.*, 1973 *apud* ABREU *et al.*, 2008).

A Bahia, por ser a maior produtora de caprinos e a segunda maior de ovinos do país com 33,7% e 19,1%, respectivamente, do efeito nacional (BRASIL, 2007), é o estado nordestino mais afetado, principalmente nas regiões semi-áridas onde os animais são criados de forma extensiva na vegetação espinhosa da caatinga, favorecendo, assim a infecção dos animais e a disseminação da doença (EBDA, 2000). Um estudo sorológico realizado no ano de 2003 em 19 municípios do semiárido baiano demonstrou uma prevalência média de 46,6% da LC em caprinos, comprovando como esta doença continua altamente prevalente neste estado (MEYER, 2003).

2.1.6 Resposta Imune

Neutrófilos e macrófagos são as células predominantes logo após a infecção, na resposta contra *C. pseudotuberculosis* (JOLLY, 1965a, HARD, 1969).

Os neutrófilos são células essenciais para a defesa contra a infecção primária, atuando para restringir o crescimento bacteriano ou agindo sobre as células infectadas de forma independente das atuações dos macrófagos e das células *Natural Killer*- NK (CONLAN; NORTH, 1991; ROGERS; UNANUE, 1993; SJÖSTEDT *et al.*, 1994). Camundongos cuja atuação destas células foi bloqueada sucumbem às infecções por *Francisella tularensis* ou *Listeria monocytogenes*, microrganismos intracelulares facultativos. Tal resultado demonstra que os neutrófilos são essenciais para restringir o crescimento destas bactérias, antes que elas sejam capazes de atingir números suficientes para oprimir o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (CONLAN; NORTH, 1991; SJÖSTEDT *et al.*, 1994).

Os macrófagos, por sua vez, atuam na eliminação dos microrganismos fagocitados principalmente pela atuação do óxido nítrico (NO), gás solúvel altamente lipofílico, produzido pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS). Esta produção pode ocorrer, prioritariamente, pela ação de citocinas pró-inflamatórias, como INF- γ e TNF- α (PÉPIN *et al.*, 1992; MACHADO, 2004; MAYER, 2006). O NO possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos através da sua

ligação direta com metais, principalmente o ferro, presente nas enzimas do seu alvo (JAMES, 1995; NATHAN; SHILOH, 2000; DUSSE, VIEIRA; CARVALHO 2003). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de *Krebs*, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular, tão importante para a sobrevivência e proliferação de microrganismos (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Nas infecções, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido (O_2^-) resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). Apesar desta poderosa ferramenta, os macrófagos podem não conseguir destruir a *C.pseudotuberculosis*. Este fato pode estar relacionado a não produção do NO quando essas células estão sob estímulos dos antígenos desses patógenos (GREEN *et al.*, 1991; BOGDAN *et al.*, 1997).

A atração de macrófagos e neutrófilos para o local da infecção, bem como a sua ativação podem ser influenciadas principalmente por um grupo de citocinas denominadas pró-inflamatórias. Dentre elas, destaca-se a citocina IL-6, que estimula a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e estimula a produção de neutrófilos (APPELBERG *et al.*, 1994; LEAL *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2011). As citocinas TNF- α e a citocina IL-1 α atuam aumentando a permeabilidade vascular permitindo a passagem de células recrutadas da resposta imune inata, além de promover a ativação destas células. O TNF- α também pode atuar como indutor de coagulação, sendo um importante agente na formação de granuloma. O INF- γ também atua ativando principalmente os macrófagos, induzindo a produção de NO e a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos-MHC de classe I e II, que atuam no processo de ativação das células da resposta imune adaptativa (NOLL *et al.*, 1996; PERRY *et al.*, 1997; ALLIE *et al.*, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011).

O INF- γ é secretado por células NK e macrófagos, como também por células da resposta imune adaptativa, tanto os linfócitos TCD4⁺, quanto os TCD8⁺. Esta citocina possui receptores em quase todas as células, onde é capaz de ativar diversas respostas antimicrobianas. Estima-se que estas citocinas regulem a

expressão de diversos genes relacionados com a produção de proteínas envolvidas na criação de barreiras efetivas contra os patógenos (PESTKA, 2004), como as moléculas de MHC classe I e II por diversos tipos de células, ativação e regulação da diferenciação de fagócitos induzindo a expressão de moléculas, co-estimulação e a produção de produtos microbicidas como radicais de oxigênio e NO, permitindo uma interação entre a resposta imune inata e adaptativa (BOEHM *et al.*, 1997; MEYER *et al.*, 2005).

Por se tratar de um microrganismo capaz de sobreviver dentro das células fagocíticas, principalmente pela inibição da produção de NO (GREEN *et al.*, 1991; BOGDAN *et al.*, 1997), uma resposta imune adaptativa que potencialize a ação da fagocitose torna-se um mecanismo importante para eliminar/conter o patógeno (JOLLY, 1965b; LAN *et al.*, 1998).

Estudos vêm mostrando que o envolvimento da resposta celular, mais especificamente, da indução de uma resposta Th1, é a mais satisfatória na resistência contra bactérias intracelulares facultativas uma vez que auxilia o mecanismo de fagocitose e destruição destes patógenos (KAUFMANN, 1993). Entretanto, o desenvolvimento de um perfil Th2 também é necessário, principalmente por atuar na formação de granulomas e, no caso desta enfermidade, na formação de anticorpos que neutralizam a exotoxina de *C.pseudotuberculosis*.

O desenvolvimento de uma resposta Th1 potente, principalmente com a produção de INF- γ , diminui e/ou impede a formação do tecido fibroso (granuloma) mostrando que esta citocina possui uma forte atividade antifibrótica (WYNN, 2004). Sabe-se que INF- γ estimula várias quimiocinas, possivelmente capazes de reduzir a vascularização, levando a hipóxia do granuloma e gerando a necrose caseosa (EHLERS, 2001).

Neste processo, a interleucina- 10 (IL-10) é um importante elemento na regulação da resposta imune. Originalmente descrita como uma citocina produzida por células Th2 e mediadora de efeitos anti-inflamatórios, atua primariamente em células fagocíticas e em células apresentadoras de antígenos, inibindo a transcrição e a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, diminuindo a resposta imune sistêmica (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; OSWALD *et al.*, 1992; MOORE *et al.*, 2001).

Esta citocina previne apoptose mediada pelo TNF- α em macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, possibilitando a manutenção da infecção crônica (ROJAS *et al.*, 1999). Por outro lado, a IL-10 modula a atividade das citocinas do perfil Th1 como o INF- γ , atuando também na regulação da formação de fibrose, importante para a formação do granuloma, mediada por citocinas do perfil Th2 como IL-4, que pode ativar um tipo de macrófago que estaria basicamente envolvido no reparo tecidual, estimulando fibroblastos e promovendo deposição de matriz extracelular que atuaria na formação do granuloma. Nessa regulação do granuloma a IL-10 interage com as citocinas do perfil Th1, como INF- γ , suprimindo a deposição de colágeno (WYNN, 2004; MOSSER; EDWARDS, 2008). Além disso, a citocina IL-4 é envolvida na formação das células gigantes multinucleadas, originadas da fusão de monócitos/macrófagos, que estão presentes nos granulomas de *M.tuberculosis*, atuando na contenção destes microrganismos (McINNIS e RENNICK, 1988).

Atualmente a IL-10 é considerada como pertencente, prioritariamente, ao perfil das células T regulatórias (Treg), juntamente com a citocina IL-13. Entretanto a IL-10 pode ser produzida por células NK, monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, principalmente por células Th2 e durante infecções crônicas pelas células Th1 (CARTER *et al.*, 2011; MOTOMURA *et al.*, 2011).

Em relação aos linfócitos TCD8⁺, Pépin e colaboradores (1994a) observaram que há mais destas células nos granulomas no sítio de inoculação do que encontrados nos linfonodos drenantes. Esta subpopulação de linfócitos estaria relacionada com a atividade efetora e citotóxica, podendo atuar como um mecanismo de proteção antibacteriana para conter a disseminação de macrófagos infectados por *C.pseudotuberculosis*. A função destas células estaria baseada na capacidade de produzir INF- γ e promover a lise de células infectadas (LAN *et al.*, 1998; CARMINATI, 2005).

2.1.7 TRATAMENTO E PROFILAXIA

O tratamento da linfadenite caseosa baseia-se na drenagem e extirpação dos linfonodos visíveis acometidos e da utilização de antibioticoterapia. Apesar do microrganismo *C. pseudotuberculosis* ser sensível a ampicilina, ao cloranfenicol, a lincomicina, a tetraciclina, a gentamicina, a penicilina, ao trimetropim, a ciprofloxacina e ao sulfametoxazol (ABREU *et al.*, 2008), estes antibióticos não são eficazes em ultrapassar a cápsula fibrosa dos granulomas, o que torna a terapia ineficaz e de custo muito elevado (OLSON *et al.*, 2002).

No que se refere à extirpação dos linfonodos acometidos, o principal entrave está na incapacidade da realização deste procedimento quando se trata de LC interna, que acomete linfonodos e/ ou outros órgãos internos do animal (ALVES e PINHEIRO, 1997). Ademais, a drenagem realizada nos linfonodos superficiais pode promover a contaminação do ambiente, uma vez que é possível encontrar um grande número de bactérias viáveis no material caseoso, na ordem de 1×10^6 e 5×10^7 UFC/g (BROWN; OLANDER, 1997 *apud* FONTAINE; BAIRD, 2008). Estas bactérias podem permanecer viáveis durante meses no solo, cerca, fezes, exudato purulento, carnes congeladas, locais úmidos e escuros, tesouras, pele, entre outros, o que pode tornar sua presença constante no ambiente de criação (RADOSTITS *et al.*, 2002; ANDERSON, RINGS e PUGH, 2005).

Sendo assim, o controle deste agravo deve estar apoiado em medidas que possam inibir a entrada/ disseminação de *C. pseudotuberculosis* no rebanho. Uma possibilidade está justamente no desenvolvimento de vacinas que sejam eficazes, além da identificação e eliminação de animais acometidos. Logo, o desenvolvimento de vacinas e de testes diagnósticos mais específicos constituem importantes instrumentos para o controle e erradicação desta enfermidade (PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998; PATON *et al.*, 2003; DORELLA *et al.*, 2006a; WINDSOR, 2011).

3. Justificativa

Muitos estudos vêm sendo realizados na busca para a obtenção de vacinas que induzam alto nível de proteção aos animais contra a LC. O laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do ICS-UFBA tem testado diferentes formulações de vacinas como exemplo utilizando a linhagem T1 que é uma bactéria presente na sua coleção, sendo mantida em sucessivas culturas em meio específico que vem sendo avaliada como uma proposta para o estabelecimento de uma vacina de primeira geração e a linhagem C57 que foi recém-coletada de um caprino naturalmente infectado.

Neste sentido, o presente trabalho visa avaliar/caracterizar a resposta imune de camundongos infectados com estas duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis*, contribuindo para mostrar o mecanismo de defesa imunológica nas infecções causadas por *C.pseudotuberculosis*.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar aspectos da resposta imunológica de camundongos *BALB/c* durante a infecção com duas diferentes linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (T1 e C57).

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

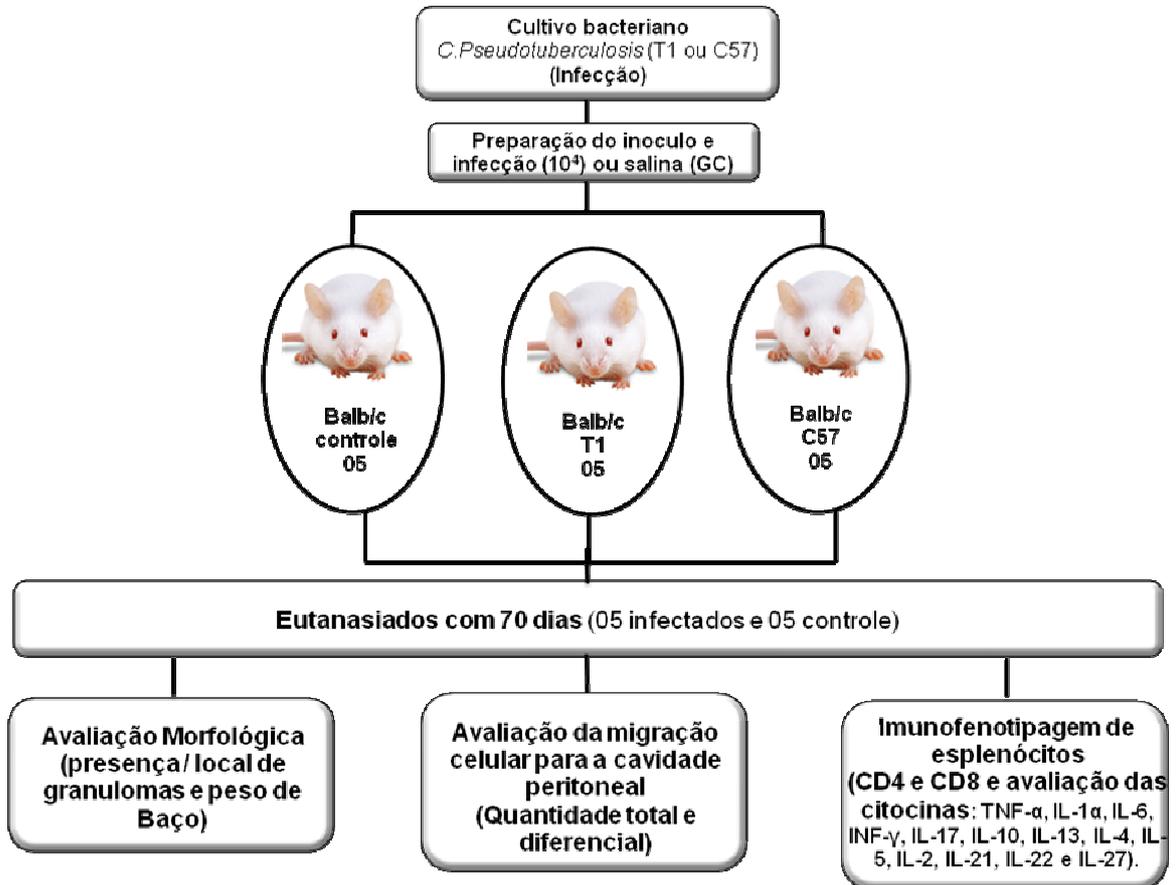
- Determinar o padrão de migração celular para a cavidade peritoneal em camundongos *BALB/c* infectados por duas linhagens da *C. pseudotuberculosis* (T1 e C57).
- Avaliar a ocorrência de esplenomegalia em camundongos *BALB/c* após infecção por duas diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* (T1 e C57).
- Identificar as principais regiões acometidas com granulomas em camundongos *BALB/c* após infecção por duas diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* (T1 e C57).
- Comparar a resposta imune celular através da imunofenotipagem (CD4 e CD8) e produção das citocinas IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27 e TNF- α , em células esplênicas de camundongos *BALB/c* infectados com duas diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* (T1 e C57).

5. HIPÓTESE

Um modelo de resposta imunológica através da infecção de camundongos com linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* poderá mostrar o mecanismo de infecção em nível de órgãos e vias de disseminação da enfermidade na forma atenuada (T1) e virulenta (C57) ?

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Delineamento experimental



6.2 Linhagens de *C.pseudotuberculosis*

Foram utilizadas as linhagens T1 e C57 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A linhagem T1 é proveniente da coleção do laboratório de Microbiologia do ICS – UFBA, isolada a partir do granuloma em linfonodos de caprinos, na região de Santa Luz, estado da Bahia, e identificada pelo teste “API coryne” (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França). Essa linhagem foi considerada naturalmente atenuada por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa que os demais isolados selvagens (DORELLA et al., 2006; MOURA-COSTA et al., 2008). A linhagem C57 foi isolada a partir de um granuloma em linfonodo parotídeo de um caprino fêmea, sem raça definida, na região de Andorinha- Ba, identificada através da cultura de *Corynebacterium* Spp., sorologia para linfadenite caseosa e PCR multiplex direto dos materiais dos granulomas para identificação de *C.pseudotuberculosis*. As linhagens foram semeadas em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e posteriormente cultivadas a 37°C por 48 horas.

6.3 Preparo do inoculo

Para a infecção, as linhagens T1 e C57 de *C.pseudotuberculosis* foram quantificadas seguindo-se o protocolo estabelecido por Sampaio (2012). Resumidamente, 0,5ml de uma cultura mantida durante 48h a 37°C de 250 ml foi retirada. O material foi lavado duas vezes, em solução salina, através de centrifugação de 04 minutos a 8.000 x g. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e acrescido o corante SYBR safe™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e incubou-se por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Nova lavagem foi realizada para a remoção dos reagentes e o *pellet* bacteriano foi ressuspensão e mensurado no citômetro de fluxo. Para este processo foram utilizados tubos TruCount (Becton Dickson, EUA), contendo *pellet* de microesferas fluorescentes, com quantidades de *beads* constantes em cada lote. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo: Bactérias totais = (Nº *beads* eventos bactérias/Nº de *beads* A+B) x Nº de *beads* por µl.

6.4 ANIMAIS

Foram utilizados no experimento 15 camundongos da linhagem *BALB/c*, com idade entre 6 - 8 semanas, de ambos os sexos, adquiridos no Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz – BA. O projeto tem a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS), com número de protocolo 006/2010: “título: **Avaliação de aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com cepa virulenta e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis***”. Os animais foram subdivididos da seguinte forma:

- 05 animais do grupo controle, nos quais foi inoculado 1 mL de solução salina (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ).
- 05 animais foram experimentalmente infectados com 10^4 /ml da linhagem T1 de *C.pseudotuberculosis* diluídos em um (01) ml de salina (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ), injetados por via intraperitoneal.
- 05 animais foram experimentalmente infectados com 10^4 /ml da linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis* diluídos em um (01) ml de salina (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ), injetados por via intraperitoneal.

Fig.5- Camundongo BALB/c

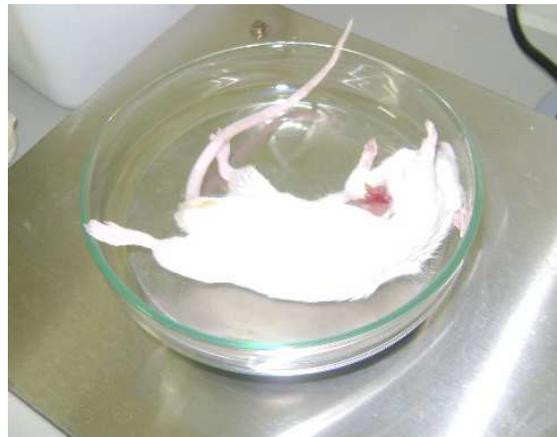


Fonte: TAVARES, I.F.2012- Arquivo

Após 70 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e em seguida os animais foram vistoriados, tanto externamente quanto na abertura das cavidades peritoneal e torácica para a observação da existência e local de ocorrência de granulomas.

Posteriormente os animais foram pesados (Fig.6). O peso corporal e o peso do baço foram obtidos utilizando uma balança de precisão (Marte Balança e Aparelhos de precisão LTDA, São Paulo-SP). A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representa em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%. Em seguida foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal, utilizando solução salina, para a determinação do padrão da migração celular. Após esta etapa, foi realizada uma incisão na região abdominal (na altura da linha alba) para remoção dos órgãos. Posteriormente foi determinado pesar o baço em 50mg, que foi macerado em 500µl de solução inibidora de protease (Sigma Aldrich Brasil Ltda) gerando uma suspensão celular. Cada suspensão foi submetida à centrifugação a 450g por 10 minutos a 4°C, obtendo-se as células esplênicas para a quantificação de citocinas e para a separação das subpopulações de linfócitos (Fig.7) e (Fig.8).

Figura 6- Pesagem do Camundongo



Fonte: TAVARES, I.F.2012- Arquivo

Figura 7- Baço retirado de camundongo BALB/c

Fonte: TAVARES, I. F. 2012- Arquivo

Figura 8- Maceração-obtenção de células esplênicas

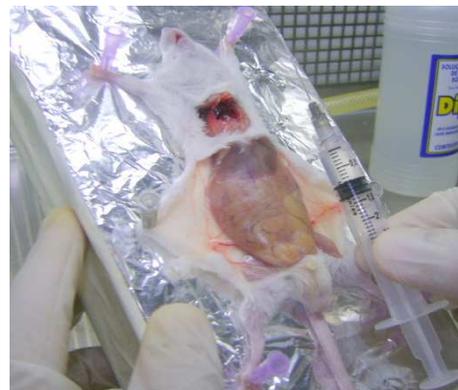
Fonte: TAVARES, I.F.2012- Arquivo

6.5 PADRÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Foi realizada uma incisão na região abdominal (na altura da linha alba-rebatendo apenas a pele sem abrir a cavidade abdominal) sempre em condições estéreis no fluxo laminar. Em seguida foram introduzidos 1,5mL de soro fisiológico na cavidade abdominal (figura 9), massageando-se o abdômem do animal por 30 segundos para em seguida recuperar o máximo do líquido introduzido utilizando uma seringa de 3 mL. Esse material foi acondicionado em tubo para microcentrifuga devidamente identificado. Foi importante definir o volume recuperado com o auxílio da marcação de volume da seringa (figura 10).

Figura 9- Introdução de 1,5ml de soro fisiológico
Na cavidade peritoneal

Fonte: TAVARES, I.F. 2012- Arquivo

Figura 10- Volume recuperado da
CP

Fonte: TAVARES, I.F.2012- Arquivo

Após definição do volume recuperado, este foi acondicionado em tubo para microcentrifuga, dos quais 40µl foram utilizados para posterior contagem de células totais, através de um contador automático de células (Hemocytometer CELM cc-530-cia. Equipadora de laboratórios Modernos, Barueri, SP). Em seguida, foi realizado o citoesfregaço (cytospin) em duplicata, acrescentando 60µl do lavado em cada caçapa do aparelho para centrifugação por 16 minutos a 500rpm em temperatura ambiente (figura 11). Logo em seguida as lâminas do aparelho foram retiradas e colocadas para a secagem e então submetidas a uma coloração de Wright e Giemsa (Sigma Chemical Co., EUA). Resumidamente, as lamina foram cobertas com 15 a 20 gotas do corante, deixando-o agir por 03 minutos, seguidamente foram acrescidos 20 gotas de água destilada por 12 minutos, finalizando com uma lavagem em água corrente. O perfil das células da cavidade foi determinado através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal, utilizando-se para isso um microscópio biológico binocular modelo L-1000 bac (Bioval, Bauru-SP) em objetiva de imersão (aumentado de 1000x).

Figura 11- Aparelho- cytospin



Fonte: TAVARES, I.F.2012- Arquivo

6.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

A resposta imune celular foi avaliada pela imunofenotipagem e pela produção de citocinas em esplenócitos, por citometria de fluxo.

6.6.1 Imunofenotipagem (Citometria de fluxo)

A imunofenotipagem foi realizada pela avaliação da expressão das proteínas CD3, CD4 e CD8 na superfície celular. Para tanto, foram utilizados anti-CD3 conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-CD8a conjugado com PE-Cy[®]5.5 e anti-CD4 conjugado com R-PE Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Todos os anticorpos monoclonais (AcMO) foram previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso. As células esplênicas foram ajustadas em 500 000 células (eventos) diluídas em 500 µL do tampão de ensaio, em seguida os anticorpos monoclonais foram acrescentados e esta mistura foi incubada, em câmara escura, durante 15 minutos. Findado o período de incubação, foi adicionado um (01)ml do tampão de ensaio em cada tubo, e em seguida foi realizada uma centrifugação a 7500xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e acrescentado 500µL de tampão de ensaio. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA) usando o programa CellQuest (Becton–Dickinson, Canadá). Para análise dos dados utilizou-se o Flowjo (Tree Star Inc, Califórnia, EUA).

6.6.2 Produção de citocinas (Citometria de fluxo)

A dosagem das citocinas presentes no homogenato do baço foi realizada através de ensaio para detecção por Citometria de Fluxo, utilizando-se para isso, *Kit* comercial Mouse Th1/Th2/Th17/Th22 13plex – Flow Cytomix (eBioscience: Bender MedSystems GmbH), para quantificar IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, INF- γ e TNF- α . Resumidamente, os padrões das citocinas avaliadas foram reconstituídos em água destilada estéril de acordo com a concentração previamente recomendada no *Kit*, para serem utilizadas na elaboração de um *mix* de citocinas, que por sua vez, foi empregado na elaboração de uma diluição seriada, utilizada como a curva padrão do ensaio. Posteriormente, foi

elaborado o *mix* das *beads* de captura, onde as *beads* referentes a cada citocina analisada foram agrupadas em um tubo Falcon de 15ml e centrifugadas a 7500 x g por 05 minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente desprezado e o “*pellet*” resuspenso com o mesmo volume de tampão de ensaio. Seguidamente, o *mix* do conjugado biotilado foi preparado também diluído em tampão de ensaio. Desta forma, o experimento foi realizado, adicionando em tubos previamente identificados a seguinte ordem: padrões das citocinas ou as amostras, em seguida o *mix* de *beads* e por ultimo o *mix* de conjugados biotilados. Estes foram incubados ao abrigo de luz e a 4°C por duas (02) horas. Findado o período de incubação, foi adicionado um (01)ml do tampão de ensaio em cada tubo que foi seguido por uma centrifugação a 7500xg durante 05 minutos. Seguidamente, foi removido 700 µL do sobrenadante e novamente lavado com o mesmo volume de tampão, que foi seguido da remoção do sobrenadante e posterior adição de 20 µL de streptoavidina-PE. Os tubos foram então homogeneizados e incubados no escuro por uma (01) hora, ao passo que, findado este período, as amostras foram novamente lavadas duas vezes e por fim resuspenso em 500µL de tampão de ensaio e acondicionadas isentas da luz a 4°C, para leitura *overnight* no citômetro de fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o FlowCytomix Pro Software, conforme orientações do fabricante.

6.6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre os três grupos de estudo, optou-se pela utilização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez que os dados obtidos não apresentavam distribuição normal. Para a comparação dos dois grupos teste com o grupo controle e dos grupos testes entre si, empregou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

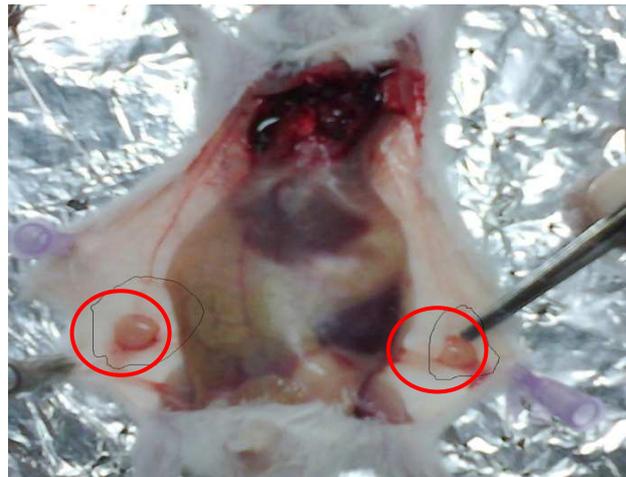
Todas as análises foram realizadas no programa Statistical (SPSS), considerando-se significantes os resultados com valores de $p < 0,05$. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o programa Graphpad prism 5.

7. RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE GRANULOMAS

O número total de animais que apresentaram granulomas nos diferentes grupos ao longo de 70 dias após a infecção pelas linhagens T1 e C57 de *C.pseudotuberculosis* e também suas principais regiões acometidas com granulomas estão demonstrados nas tabela 1 e 2, respectivamente. Observou-se que dos cinco animais infectados com a linhagem T1 apenas um apresentou granulomas. Diferente do grupo infectado com a linhagem C57 onde todos os animais desenvolveram granulomas em alguma região anatômica como nos linfonodos, rins e testículos (figura 12).

Figura 12- Camundongo BALB/c com granulomas em linfonodos inguiniais infectado com a linhagem C57 de *C.pseudotuberculosis*



Fonte: TAVARES, I.F.2012- Arquivo

Tabela 2- Cronologia da incidência dos granulomas ao longo de 70 dias após a infecção experimental em camundongos

<i>Tempo</i>	<i>BALB/c- controle</i>	<i>BALB/c- infec.T1</i>	<i>BALB/c- infec.C57</i>	<i>Total</i>
70 dias	00/05	01/05	05/05	06/15

Fonte: TAVARES, I. F. 2012

Tabela 3 - Distribuição dos granulomas de acordo com as regiões anatômicas em camundongos

<i>Região Anatômica</i>	<i>BALB/c- controle</i>	<i>BALB/c- Infec.T1</i>	<i>BALB/c- Infec.C57</i>
Linfonodos	00	01	04
Rim	00	00	01
Testículos	00	00	01
Total	00	01	06

Fonte: TAVARES, I.F. 2012

7.2 AVALIAÇÃO DO PESO DO BAÇO

Os valores encontrados referentes à relação entre o peso corporal e o peso do baço dos animais apresentados no gráfico 1 logo após a eutanásia. Fazendo comparação dos grupos observou-se que não ocorreu diferença estatística entre o grupo controle e o grupo de animais infectados por 10^4 /ml da linhagem T1. Entretanto, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo dos animais infectados por 10^4 /ml da linhagem C57 e entre o grupo dos animais infectados por 10^4 /ml da linhagem T1 e o grupo dos animais infectados por 10^4 /ml da linhagem C57.

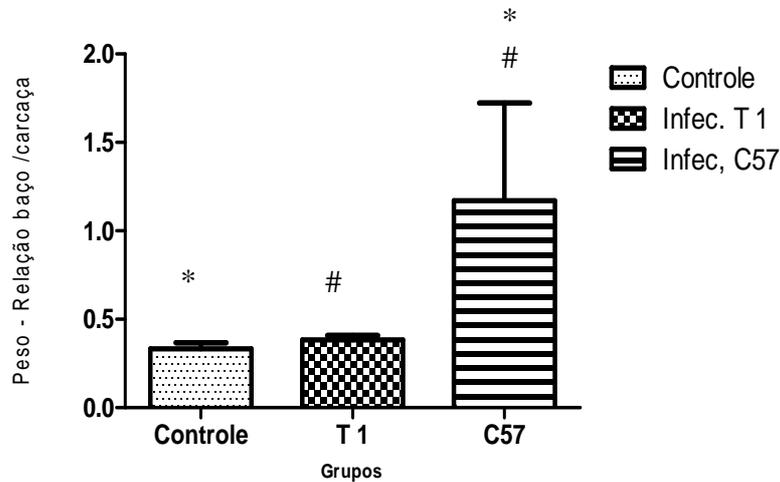


GRÁFICO 1- Determinação do peso do baço de camundongos *BALB/c* infectados experimentalmente com 10^4 /ml por duas linhagens (T1 e C57) de *C.pseudotuberculosis*. O peso corporal e o peso do órgão foram determinados pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo. Sendo este considerado 100%. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, tendo, a comparação das médias entre os grupos, por Mann-Whitney.

(*) Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle

(#) Diferença estatisticamente significativa quando comparado entre as infecções T1 e C57. $p < 0,05$

7.3 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS DO LAVADO PERITONEAL

A comparação do teor de células nos diferentes grupos, mostrou que houve diferença significativa na quantidade total de células entre o grupo controle e o grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem T1 e também entre o grupo controle e o grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem C57 de *C.pseudotuberculosis* ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem T1 de *C.pseudotuberculosis* e entre o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem C57.

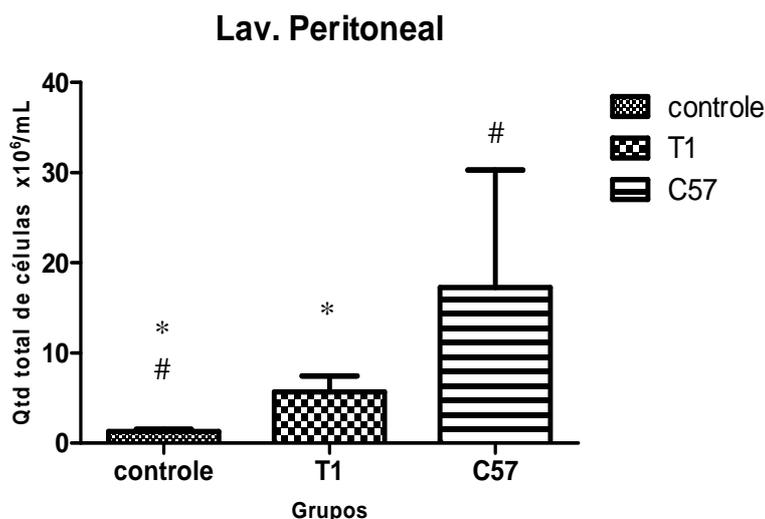


GRÁFICO 2- Células aspiradas de camundongos *BALB/c* infectados com duas linhagens de *C. pseudotuberculosis* (T1 e C57) e processadas pelo contador automático de células CELM cc-530. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis e verificou-se uma diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$ entre o grupo controle e infectado com * e entre o grupo controle e infectado com # de *C. pseudotuberculosis*

7.4 ANÁLISE DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS (LEUCOGRAMA)

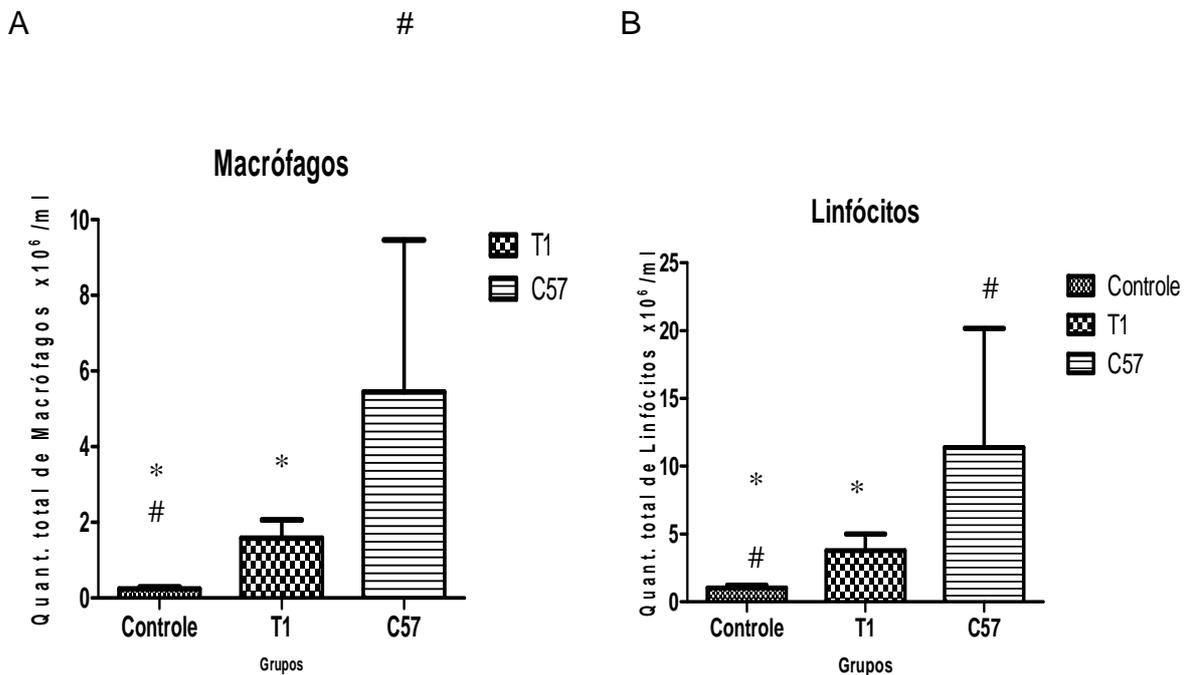
O gráfico 03 refere-se ao diferencial leucocitário do lavado peritoneal. O gráfico 3A representa os valores absolutos de macrófagos encontrados nos camundongos *BALB/c* infectados pelas linhagens de *C. pseudotuberculosis* (T1 e C57) com 70 dias após a infecção. Observou-se um ($p < 0,05$) para 70 dias de infecção entre o grupo controle e o grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem T1, mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre eles. Houve também diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis* com ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença estatística entre o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem T1 e o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis*.

O gráfico 3B representa os valores absolutos de linfócitos encontrados nos camundongos *BALB/c* infectados pelas linhagens de *C. pseudotuberculosis* (T1 e C57) com 70 dias após a infecção. Observou-se um ($p < 0,05$) para 70 dias de infecção entre o grupo controle e o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem T1, mostrando diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Houve também diferença estatística entre o grupo controle e o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis*. Entretanto, não houve uma diferença

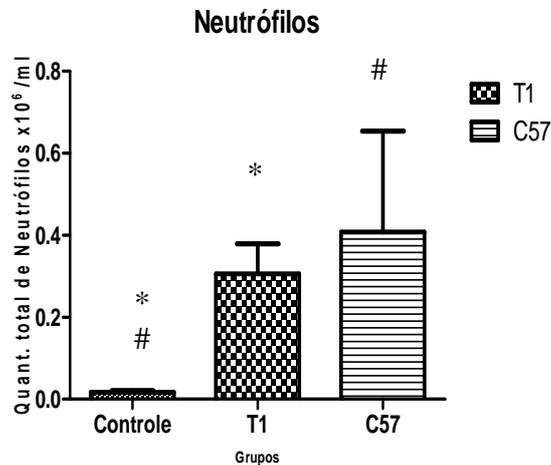
estatística entre o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem T1 e o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem C57 de *C.pseudotuberculosis*.

O gráfico 3C representa os valores absolutos de neutrófilos encontrados nos camundongos *BALB/c* infectados pelas linhagens T1 e C57 de *C.pseudotuberculosis* com 70 dias após a infecção. Observou-se ($p < 0,05$) no grupo controle e no grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem T1, mostrando que houve diferença estatística entre os grupos. Em relação ao grupo controle e o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem C57 observou-se que também houve diferença estatisticamente significativa. Entretanto, não houve diferença estatística entre o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem T1 e o grupo infectado com 10^4 /ml da linhagem C57.

Com relação ao gráfico 3D não houve diferença estatística na migração dos mastócitos entre o grupo controle e o grupo de animais infectados com ambas as linhagens (T1 e C57) de *C.pseudotuberculosis*.



C



D

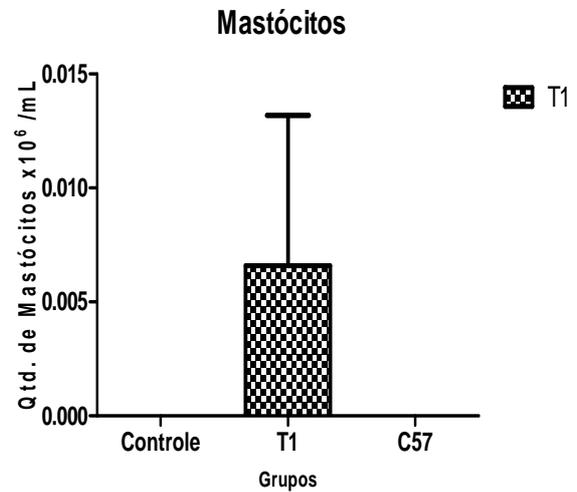


GRÁFICO 3- Células aspiradas com soro fisiológico e processada no cytopspin, por 16 minutos a 500 rpm, após 70 dias de infecção por duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis*. Foi realizada a avaliação através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal. A comparação entre os grupos foi realizada por kruskal- Wallis.

7.5 AVALIAÇÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM

Comparando os diferentes grupos estudados, quanto à imunofenotipagem, não foi possível observar diferenças estatísticas na média de intensidade de fluorescência (MIF) para as células CD4+, nem na MIF para as células CD8+ (Gráficos 4A e 4B).

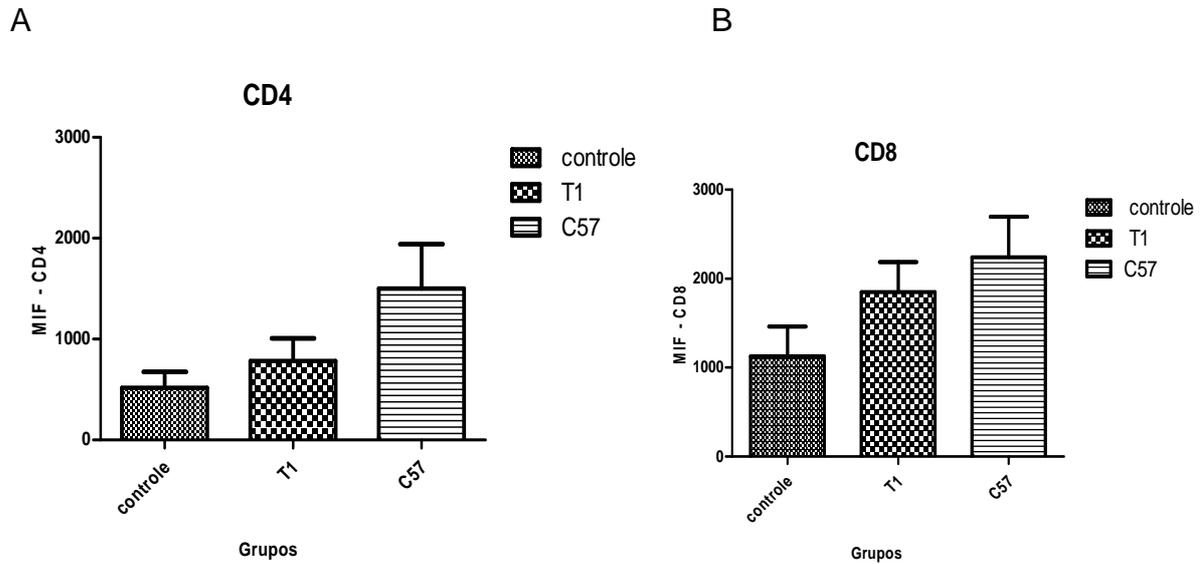


GRÁFICO 4- Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de moléculas CD4+ e CD8+, no homogenato do baço de camundongos BALB/c infectados pelas T1 e C57 diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis*. Analisados por citômetro de fluxo FACs calibur. A comparação entre os grupos foi realizada por kruskal- Walis. Não foi possível identificar diferenças estatísticas significativas tanto para os valores de MIF de CD4+ quanto para os valores do MIF de CD8+.

7.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS ESPLÊNICAS

Nos gráficos de 5 a 15 mostram a produção de citocinas (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, INF- γ , IL-21, IL-22, IL-27) pelas células esplênicas de camundongos *BALB/c* infectados pelas linhagens T1 e C57 *C. pseudotuberculosis* com 70 dias após a infecção. Entretanto, em relação às citocinas TNF- α e IL-17 não foram produzidos valores detectáveis destas.

Os níveis de produção de IL-2 por células esplênicas de camundongos *BALB/c* foram mais elevados no grupo controle e no grupo infectado por 10⁴/ml da linhagem T1. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

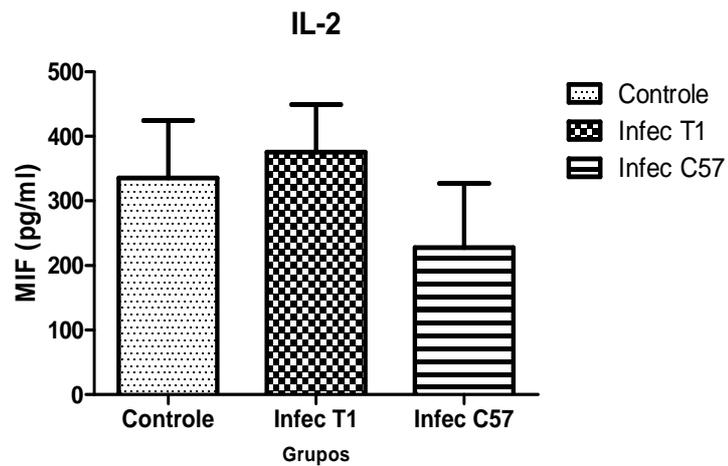


GRÁFICO 5- Produção de IL-2 por células esplênicas de camundongos *BALB/c* com 70 dias após a infecção pelas linhagens *T1* e *C57* de *C.pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que não apresentou diferença estatística para a IL-2.

Em relação aos níveis de produção de IL-1 α (gráfico 6) os camundongos infectados com a linhagem *T1* de *C.pseudotuberculosis* apresentaram produção bem mais elevada do que os camundongos infectados com a linhagem *C57* ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e ambas as linhagens de *C. pseudotuberculosis*.

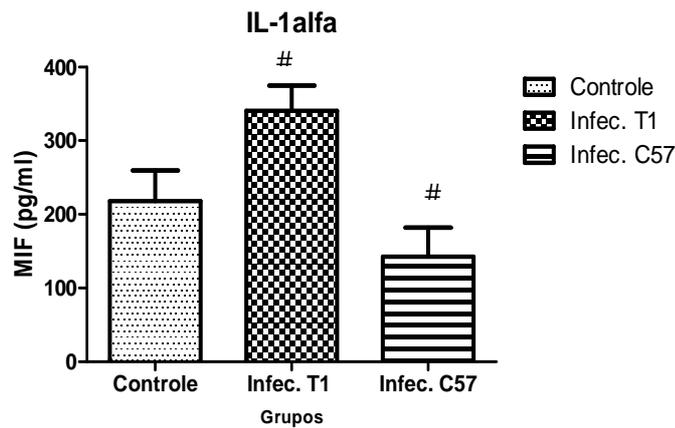


GRÁFICO 6- Produção de IL-1 α por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção pelas linhagens T1 e C57 de *C.pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que apresentou diferença estatística para a IL-1 α entre os grupos infectados com ambas linhagens de *C.pseudotuberculosis*

Na dosagem da interleucina-4 (IL-4) (gráfico 7) observou-se que ocorreu baixos níveis de produção desta citocina por células esplênicas de camundongos BALB/c no grupo controle e no grupo infectado por 10⁴/ml da linhagem T1 e um aumento nos níveis desta citocina no grupo infectado por 10⁴/ml da linhagem C57 de *C.pseudotuberculosis*, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

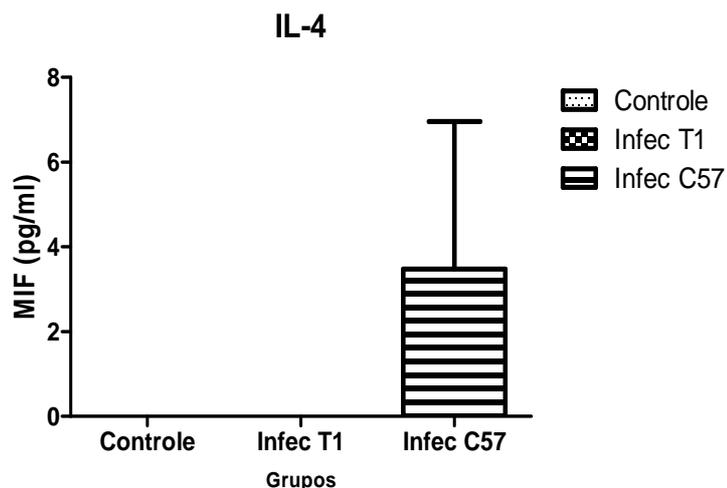


GRÁFICO 7- Produção de IL-4 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção pelas linhagens T1 e C57 de *C. pseudotuberculosis*). A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que não apresentou diferença estatística para a IL-4.

Os níveis de produção da interleucina-5 (IL-5) por células esplênicas de camundongos *BALB/c* foi mais elevado no grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem T1 em relação ao grupo controle e ao grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis*. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (gráfico 8).

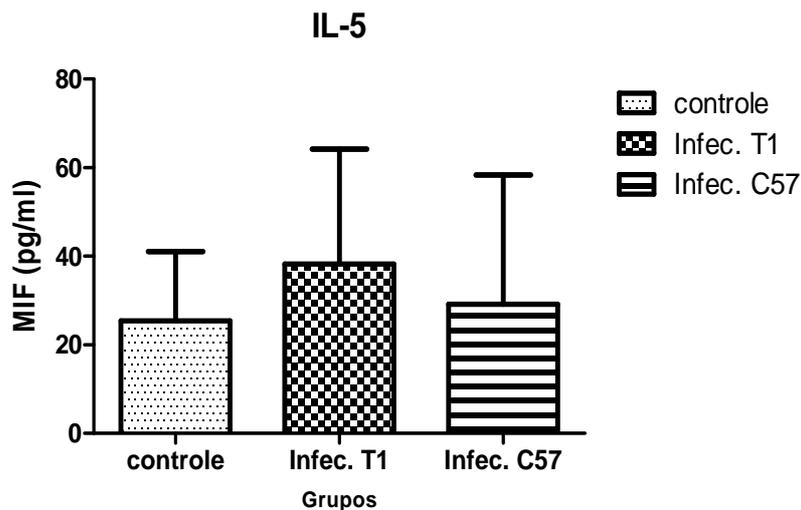


GRÁFICO 8- Produção de IL-5 por células esplênicas de camundongos *BALB/c* com 70 dias após a infecção pelas linhagens *T1* e *C57* de *C. pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que não apresentou diferença estatística para a IL-5.

Na dosagem da interleucina-6 (IL-6) representada no gráfico 9 observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os animais do grupo controle e os animais infectados por 10^4 /ml da linhagem T1 e também houve diferença significativa entre os animais infectados com a linhagem T1 e os animais infectados por 10^4 /ml da linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis*.

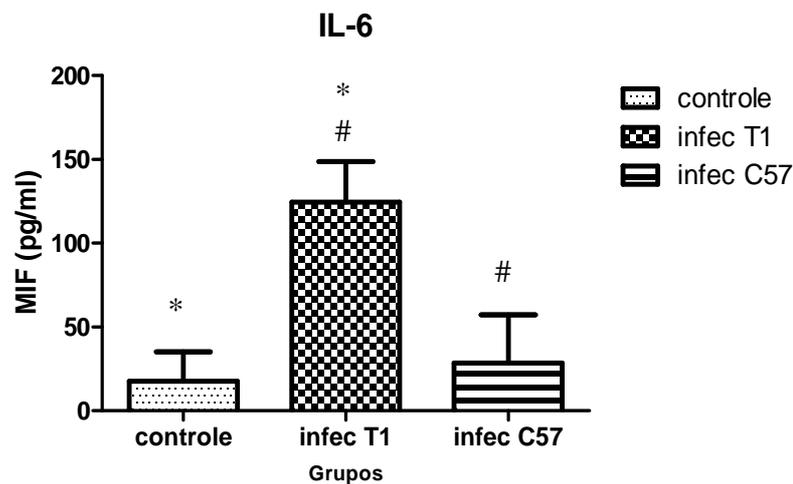


GRÁFICO 9- Produção de IL-6 por células esplênicas de camundongos *BALB/c* com 70 dias após a infecção por pelas linhagens *T1* e *C57* de *C.pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que apresentou diferença estatística para a IL-6.

Na dosagem de IL-13 onde os níveis de produção desta citocina por células esplênicas de camundongos *BALB/c* (gráfico 10) foi elevado no grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem *T1* de *C.pseudotuberculosis* em relação ao grupo controle e ao grupo infectado pela linhagem *C57*, entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem *T1* de *C. pseudotuberculosis* ($p < 0,05$).

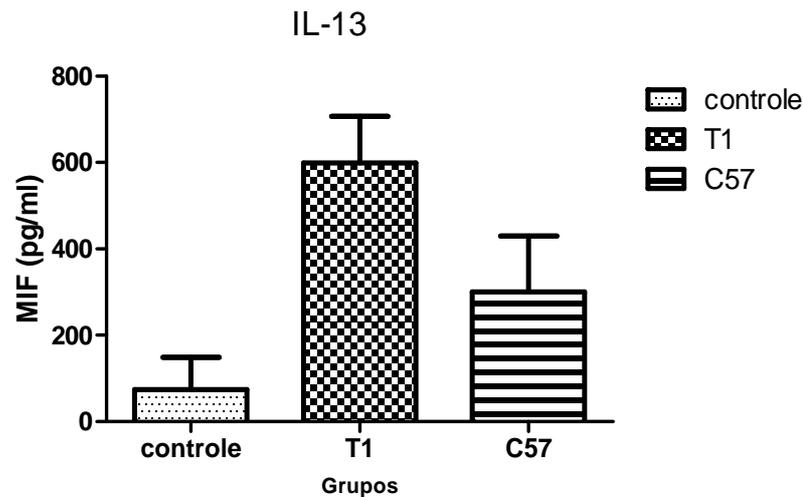


GRÁFICO 10- Produção de IL-13 por células esplênicas de camundongos *BALB/c* com 70 dias após a infecção pelas linhagens *T1* e *C57* de *C.pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que apresentou diferença estatística para a IL-13.

Na dosagem de interferon-gamma (INF- γ) representada no gráfico 11 observou-se que houve um aumento do nível desta citocina por células esplênicas de camundongos *BALB/c* infectado por 10^4 /ml da linhagem *T1* de *C. pseudotuberculosis* em relação ao grupo controle e ao grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem *C57*. Entretanto, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

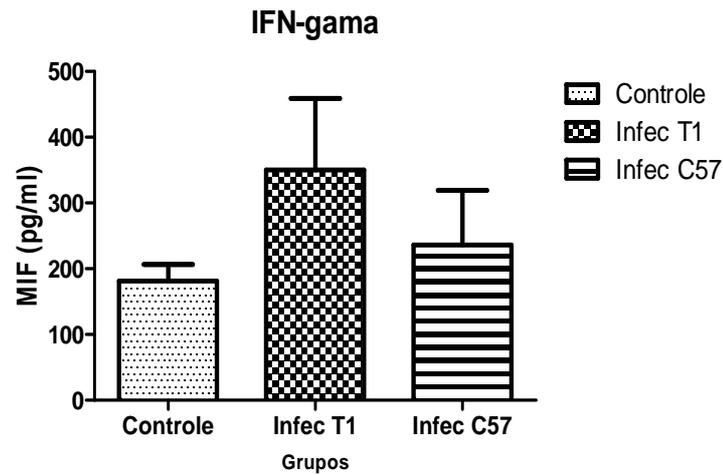


GRÁFICO 11- Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos *BALB/c* infectados por pelas linhagens *T1* e *C57* de *C. pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal- Wallis, que não apresentou diferença estatística para a IFN- γ .

Em interleucina 10 (IL-10) a dosagem apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os animais infectados por 10^4 /ml da linhagem *T1* e os animais infectados por 10^4 /ml da linhagem *C57* de *C. pseudotuberculosis* (gráfico 12).

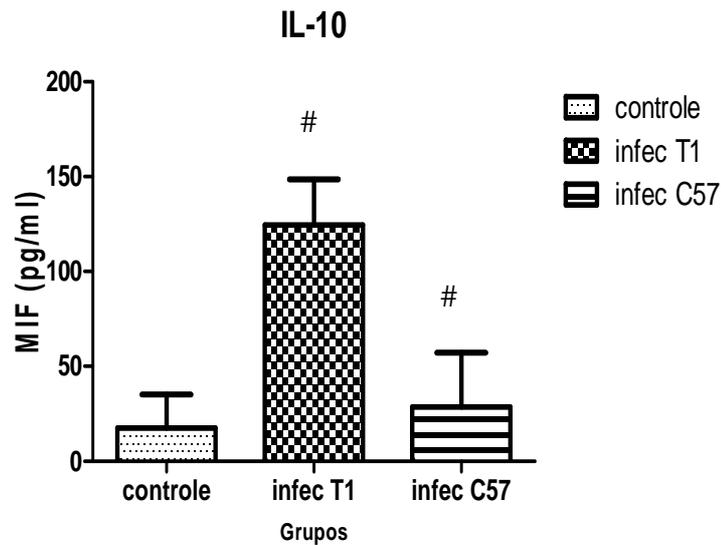


GRÁFICO 12 - Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos *BALB/c* com 70 dias após a infecção pelas linhagens *T1* e *C57* de *C. pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que apresentou diferença estatística para a IL-10 ($p < 0,05$).

Para a interleucina 22 (IL-22) observou-se que teve um aumento dos níveis de produção desta citocina por células esplênicas de camundongos *BALB/c* infectados por 10^4 /ml da linhagem *T1* em relação ao grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem *C57* de *C. pseudotuberculosis*, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

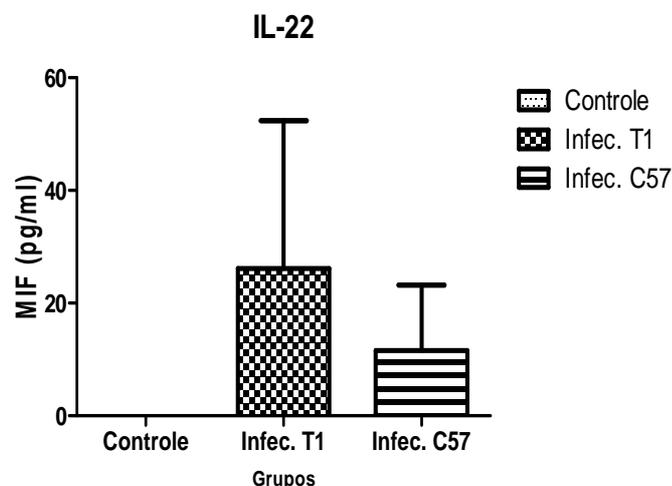


GRÁFICO 13- Produção de IL-22 por células esplênicas de camundongos *BALB/c* com 70 dias após a infecção pelas linhagens *T1* e *C57* de *C.pseudotuberculosis*. A quantificação foi

realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que não apresentou diferença estatística para a IL-22.

Na dosagem da interleucina 21 (IL-21) observou-se que ocorreu um aumento nos níveis de produção desta citocina por células esplênicas de camundongos *BALB/c* tanto no grupo controle quanto, no grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem T1 e baixos níveis de produção no grupo dos animais infectados pela linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis*, entretanto, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

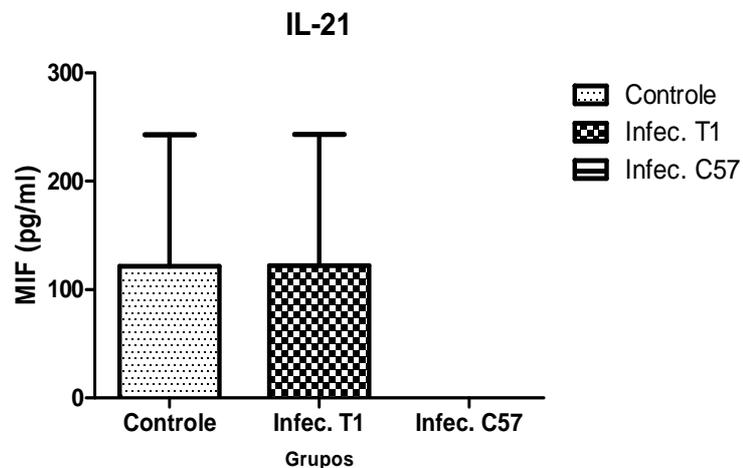


GRÁFICO 14- Produção de IL-21 por células esplênicas de camundongos *BALB/c* com 70 dias após a infecção pelas linhagens T1 e C57 de *C. pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que não apresentou diferença estatística para a IL-22.

Na dosagem da interleucina 27 (IL-27) observou-se que ocorreu um aumento no nível de produção desta citocina por células esplênicas de camundongos *BALB/c* no grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis* em relação ao grupo controle e ao grupo infectado por 10^4 /ml da linhagem T1, entretanto, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (gráfico 15).

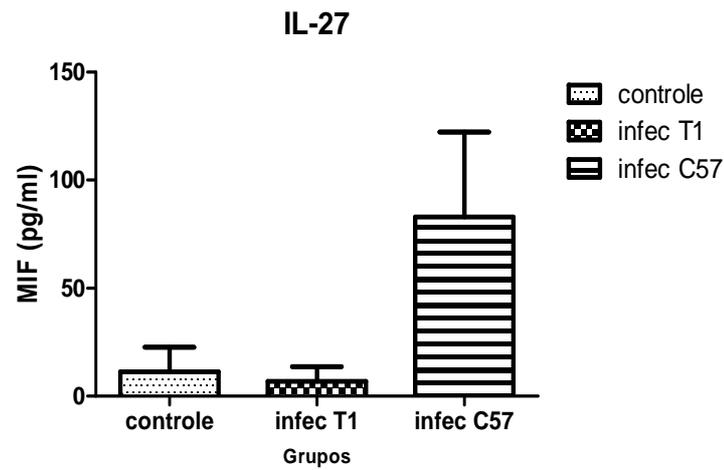


GRÁFICO 15- Produção de IL-27 por células esplênicas de camundongos BALB/c com 70 dias após a infecção pelas linhagens *T1* e *C57* de *C.pseudotuberculosis*. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que não apresentou diferença estatística para a IL-27.

8. DISCUSSÃO

A resposta imune do hospedeiro promovida contra *C.pseudotuberculosis* é complexa e envolve tanto a resposta imune mediada por células, quanto à resposta imune humoral (ELLIS *et al.*, 1990)

O modelo murino foi escolhido tendo em vista que a Linfadenite Caseosa se desenvolve nestes animais também de modo crônico, são animais de fácil manejo, apresentam linhagens isogênicas com diferentes capacidades de resposta imune e existe uma grande disponibilidade de reagentes específicos para experimentos com esta espécie (VALE, 2005). Ademais, a infecção experimental de camundongos reproduz os principais aspectos observados em caprinos e ovinos. A linhagem *BALB/c* foi escolhida por ser mais susceptível a infecção por *C. pseudotuberculosis* (SOUZA, 2009).

Neste contexto, os experimentos descritos foram desenvolvidos com o intuito de comparar a resposta imune estabelecida pela infecção por *C. pseudotuberculosis*, uma considerada atenuada (T1), que faz parte do acervo do laboratório de Microbiologia-ICS UFBA há muito tempo, sendo mantida em sucessivas culturas em meio específico e avaliada como uma proposta para o estabelecimento de uma vacina, e a linhagem selvagem (C57) que foi isolada a partir de um granuloma em linfonodo parotídeo de um caprino fêmea, sem raça definida, na região de Andorinha- Ba em 2010 (FEHLBERGA, 2011).

Analisando os resultados obtidos verificou-se a presença de granulomas ao longo de 70 dias após a infecção experimental pelas linhagens T1 e C57 de *C.pseudotuberculosis* e observou-se que todos os animais infectados com a linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis* apresentaram granulomas em alguma região anatômica como: (lífonodos, rins e testículos) diferentes dos animais infectados com a linhagem T1 onde apenas um animal apresentou granulomas na região do linfonodo . Esses resultados corroboram com os achados de Nieto e colaboradores (2009) e Souza (2009), que relataram que após a inoculação experimental em camundongos com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* ocorria o tropismo para o fígado, baço, pulmão e linfonodo mesentérico sendo diferente para cada linhagem. Observou-se também que o linfonodo é a região anatômica mais acometida com granulomas e esses dados são pertinentes com os

achados de Riet-Correa (2001), Moura-Costa (2002) e Baird & Fontaine (2007) . A disseminação dessa infecção pode ocorrer pela via linfática, com o acometimento de linfonodos torácicos e dos pulmões e posteriormente de outros órgãos (BATEY, 1986; ALVES *et al.*, 1997) e pela via sanguínea, que resulta na formação de abscessos em órgãos, podendo ocorrer na ausência de lesões periféricas (RADOSTITS *et al.*, 2002).

Os resultados referentes à avaliação do peso do baço observou-se que houve um aumento deste principalmente no grupo dos animais infectados pela linhagem C57, apresentando os maiores valores para esta relação.

Estudos de Moura-Costa (2002) e Baird e Fontaine (2007) demonstraram que durante a inoculação experimental de *C. pseudotuberculosis* em camundongos, independentemente da localização da bactéria, a disseminação ocorre por todo o organismo, livre ou no interior dos fagócitos, com predominância nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário (linfonodos, baço), além do rim, fígado, pulmões e intestinos. Dutta *et al.* (2009) e Dias *et al.* (2011) relataram também que o baço está correlacionado diretamente com a utilização da via sanguínea por diversos microrganismos para promover a disseminação gerando uma esplenomegalia, desta forma é possível sugerir que a bactéria C57 foi mais eficiente na distribuição pelo organismos do animal quando comparada com a linhagem T1. Este fato pode estar relacionado ao conjunto dos fatores de virulência desta linhagem.

A resposta imune inata foi avaliada com base no padrão de migração celular para a cavidade peritoneal, realizada pela quantificação total e diferencial de células. Observou-se que os animais infectados pela linhagem C57 apresentaram contagem total de leucócitos maior em relação aos animais do grupo controle e dos animais infectados com a linhagem T1. Porém, a migração de células circulantes para os tecidos (diapedese), é direcionada pela presença de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sitio inflamatório (BILATE, 2007). Entretanto, nos tecidos, células importantes como os fagócitos, incluindo os neutrófilos e os macrófagos participam de respostas funcionais na defesa do hospedeiro cuja principal função destas é recrutar as células para os locais de infecção e identificar, ingerir e destruir os microrganismos (ABBAS *et al.*,2008).

A análise da contagem diferencial de células (leucograma) foi realizada pela avaliação morfológica de 200 leucócitos presentes em citoesfregaço (cytospin)

utilizando o material obtido do lavado peritoneal. Observou-se que ocorreu um aumento na quantidade total de macrófagos, linfócitos e neutrófilos tanto no grupo infectado pela linhagem T1 como no grupo infectado pela linhagem C57 em relação ao grupo controle. Porém, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre ambas as linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Observou-se também que os neutrófilos foram as células que permaneceram por mais tempo no local da inoculação. A partir destas observações, foi possível identificar que durante a infecção com a linhagem C57 ocorreu um maior direcionamento celular, entretanto os tipos e proporções celulares não diferem entre as linhagens estudadas.

Esses dados estão de acordo com os achados de Pépin *et al.* (1991,1992,1997), relataram que neutrófilos e macrófagos são as células predominantes logo após a infecção na resposta contra *C. pseudotuberculosis*. Os neutrófilos são a população mais abundante de células sanguíneas brancas circulantes e medeiam as fases mais iniciais da infecção entre 1-4 dias recrutando-se para o local de inoculação. E três dias após a infecção ocorre uma diminuição dessas células e um aumento significativo no número de macrófagos no local da inoculação. Paton *et al.* (2003) trabalhando com ovinos, observaram que a partir da infecção por via oral, respiratória ou contaminação de feridas, *C. pseudotuberculosis* é ativamente fagocitada por neutrófilos e macrófagos.

A avaliação da resposta imune adaptativa foi realizada através da mensuração da população de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ presentes no baço de cada camundongo *BALB/c*, através da imunofenotipagem realizada pela citometria de fluxo. De acordo com Lan *et al.*, (1998), Machado *et al.* (2004), Carminati (2005), Muthurin *et al.* (2009) e Brandão *et al.*, (2012) a resistência às infecções causadas por bactérias intracelulares facultativas está relacionada às células TCD4⁺ e mais especificamente aos clones Th1, pelo aumento da atividade microbicida dos macrófagos pela produção de INF- γ e Fator de Necrose Tumoral- alfa (TNF- α). O papel das células TCD8⁺ na resistência deste tipo de infecção está relacionado à capacidade de produzir INF- γ e lisar as células infectadas.

Comparando a determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos *BALB/c* com 70 dias após a infecção pelas linhagens de *C.pseudotuberculosis* verificou-se que houve um aumento da expressão dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nos animais infectados pela linhagem C57

diferente dos animais infectados pela linhagem T1 onde houve aumento da expressão dos linfócitos TCD8+. Portanto, não houve diferença estatisticamente significativa na média de intensidade de fluorescência entre os linfócitos TCD4+ e TCD8+. Entretanto é possível visualizar um aumento destas células nos animais infectados com a linhagem C57.

Em estudos de Denis (1991), Kauffman (1993) e Machado *et al.* (2004) relataram que a resposta imune adaptativa começa quando os linfócitos T reconhecem os antígenos associados às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e apresentados pelas células infectadas. Conseqüentemente, estes linfócitos ativados liberam citocinas que vão atrair células inflamatórias e ativar macrófagos. Dentro dos macrófagos bactérias intracelulares podem estimular tanto as células TCD4+ através da expressão de antígenos associados ao MHC classe II, como também células TCD8+ através da expressão de antígenos associados à molécula do MHC classe I. A ativação de células TCD4+ leva a secreção de INF- γ que ativa macrófagos, a produção aumentada de óxido nítrico e destruição da bactéria. As células TCD8+ participam do mecanismo de defesa através da citotoxicidade, destruindo os macrófagos infectados.

No contexto imunológico, as células TCD4+ podem se diferenciar em subconjuntos de células efetoras que produzem conjuntos diferentes de citocinas e, portanto, desempenham funções efetoras distintas. Os subconjuntos mais bem definidos de células T efetoras da linhagem auxiliar CD4+ são as células Th1 e Th2. As células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias como INF- γ , TNF- α , IL-1 α e IL-17, enquanto que as células Th2 secretam preferencialmente citocinas antiinflamatórias como: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (ABBAS *et al.*,2008).

Dentre as citocinas classificadas como pró-inflamatórias tem-se o INF- γ esta é a citocina de assinatura do perfil Th1 e entre as suas ações biológicas destaca-se a ativação dos macrófagos para destruir microrganismos fagocitados, age nas células B para promover a troca de isótipo para anticorpos opsonizadores e fixadores de complemento e estimula a expressão de moléculas do MHC classe I e classe II e co-estimuladores em APCs (BOEHM *et al.*,1997; MEYER *et al.*, 2005; ABBAS *et al.*, 2008). Esta citocina é o principal indutor da função efetora na infecção de macrófagos com micobactérias desenvolvendo também um papel significativo na

formação e organização de granulomas na resposta contra esse patógeno (EHLERS, 2001).

Ao longo dos 70 dias após a infecção, observou-se que houve aumento dos níveis de INF- γ no grupo dos animais infectados pela linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*. Diferente do grupo controle e do grupo de animais infectados pela linhagem C57 onde obtiveram níveis mais baixos dessa citocina, entretanto não houve diferença significativa entre os grupos.

Segundo Wynn (2004), a baixa produção de INF- γ concomitante ao aumento na produção de IL-4 está associada à formação e manutenção do granuloma.

O TNF- α tem como sua principal função biológica estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção e ativar essas células para erradicar microorganismos (ABBAS, 2008). Esta citocina tem um papel crucial na fase inicial da infecção (LAN e colaboradores, 1998, 1999). Estudos realizados por Pépin e outros (1997) esclareceram também a ligação entre a formação de granulomas e expressão de algumas citocinas (INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e MCP-1).

Verificou-se que a dosagem de TNF- α não produziram valores detectáveis desta citocina ao longo de 70 dias após a infecção pelas linhagens T1 e C57 de *C. pseudotuberculosis*.

Pépin e colaboradores (1997) avaliaram a expressão do RNAm de citocinas após a inoculação em ovinos com uma linhagem atenuada e selvagem de *C. pseudotuberculosis* e este estudo revelou que no local de inoculação experimental, os níveis de citocinas inflamatórias como o TNF- α e IL-1 β foram aumentados desencadeando o desenvolvimento de granulomas.

Souza (2009) trabalhando com camundongos CBA infectados com uma linhagem atenuada e virulenta de *C. pseudotuberculosis* observou que os animais infectados com a linhagem virulenta produziram mais TNF- α em relação aos animais infectados com a linhagem atenuada após um mês de infecção sob estímulo dos antígenos secretados/excretados. Entretanto, esses dados não corroboram com os resultados encontrados possivelmente devido ao protocolo escolhido para a quantificação desta citocina, uma vez que, Souza (2009) utilizou para a quantificação o sobrenadante do cultivo de células esplênicas estimuladas com estes antígenos, ao passo que foi utilizado para este protocolo, a quantificação do sobrenadante do macerado do baço.

Neste estudo, os níveis de IL-2 teve um aumento no grupo controle e no grupo dos animais infectados pela linhagem T1 e observou-se também baixos níveis de produção desta citocina no grupo dos animais infectados pela linhagem C57 *C.pseudotuberculosis*. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos. Esta citocina é produzida principalmente por linfócitos TCD4+ e age como um fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação para linfócitos. Ela funciona também como um fator de crescimento autócrino ou parácrino e estimula o crescimento de células NK, facilitando sua ação citolítica o que se faz importante na contenção da infecção por *C.pseudotuberculosis*. No mesmo estudo realizado por Pépin e colaboradores (1997) após a inoculação em ovinos por duas diferentes linhagens de *C.pseudotuberculosis* (atenuada e selvagem) observaram que a IL-2 obteve uma regulação positiva e uma maior expressão no sétimo dia após a inoculação. Este fato pode explicar a ausência de diferenças entre os grupos estudados, uma vez que a avaliação realizada neste experimento foi realizada após 70 dias da infecção.

A IL-4 é a citocina de assinatura do perfil Th2. Esta citocina obteve baixos níveis de produção tanto no grupo controle quando no grupo infectado pela linhagem T1 e um pequeno aumento nos níveis de produção no grupo de animais infectados pela linhagem C57. A IL-4 induz as células T virgens a se desenvolverem em células capazes de produzir mais IL-4 e uma série de outras citocinas antiinflamatórias e/ou regulatórias, incluindo IL-4, IL-10 e IL-13, bem como suprime o aparecimento de células TCD4 produtoras de INF- γ , podendo promover em alguns casos a sobrevivência de patógenos por limitar a ativação de macrófagos (NELMS *et al.*, 1999; HESS, 2001).

A dosagem da interleucina 10 (IL-10) apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os animais infectados pela linhagem T1 e os animais infectados pela linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis*. E observou-se também que ocorreu uma diminuição da produção da citocina IL-10 no grupo dos animais infectados pela linhagem C57 de *C.pseudotuberculosis*. Esta citocina é produzida por células Th2 e mediadora de efeitos anti-inflamatórios, atuando primariamente por células Th2 e mediadora de efeitos anti-inflamatórios, atuando primariamente em células fagocíticas e em células apresentadoras de antígenos, inibindo a transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IL-12, a expressão do MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias, bem como a produção de

intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (FIORENTINO, BOND e MOSMANN, 1989; OSWALD *et al.*, 1992; MOORE *et al.*, 2001). Estudos em diversos modelos murinos vêm demonstrando que esta citocina além de regular a atividade das citocinas do perfil Th1 como INF- γ , também regula a formação de fibrose (granuloma) mediada por citocinas do perfil Th2 como IL-4. Nessa regulação do granuloma a IL-10 interage com as citocinas do perfil Th1 como INF- γ suprimindo a deposição de colágeno (WYNN, 2004). Desta maneira, a diminuição apresentada pelos animais infectados com a bactéria C57 deveria contribuir para a eliminação e controle deste microrganismo uma vez que ativaria uma resposta Th1 com maior produção de INF- γ , fato este que não foi identificado neste trabalho.

Com relação à dosagem de IL-13 observou-se um aumento nos níveis de produção desta citocina por células esplênicas dos camundongos *BALB/c* no grupo dos animais infectados pela linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis* em relação ao grupo controle e ao grupo dos animais infectados pela linhagem C57. Entretanto, houve diferença estatística entre os grupos. Esta citocina está diretamente relacionada com a resposta da subpopulação Th2, principalmente envolvida com resposta para helmintos (PRICCE *et al.*, 2010, WYNN, 2003), entretanto o perfil Th2 pode contribuir para a formação/maturação de granulomas, que são importantes no controle de microrganismos intracelulares, através do estímulo para a produção de fibrinogênio e fatores de crescimento de tecido conectivo (LIU *et al.*, 2012 ; MC FARLANE *et al.*, 2011 ; MURRAY *et al.*, 2006 ; REIMAN *et al.*, 2006).

A análise dos níveis de IL-17 mostrou que não foram produzidos valores detectáveis ao longo de 70 dias após a infecção pelas diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Esta citocina é produzida por células TCD4+ pró-inflamatórias, denominadas células Th17 (KHADER ; COOPER, 2008). Estudos mostraram que as células T gamma-delta são as principais células produtoras de IL-17 durante infecções por *Mycobacterium*. A IL-17 contribui para a resposta imunológica contra infecções micobacterianas promovendo o recrutamento de neutrófilos e induzindo a formação de granulomas (OKAMOTO YOSHIDA *et al.*, 2010).

Em relação aos níveis de IL-22 observou-se, que teve um aumento dos níveis desta citocina nos grupos dos animais infectados pela linhagem T1 em relação ao grupo controle e ao grupo dos animais infectados pela linhagem C57 que obtiveram níveis mais baixos de produção. As principais fontes desta citocina são as células T

ativadas e células NK, sendo que a polarização de células T para um fenótipo tipo Th1 aumenta ainda a expressão de IL-22, enquanto que a polarização em direção ao tipo Th2 ou o fenótipo regulador reduz, sendo a mais alta expressão de IL-22 detectada em células TCD4+ de memória (WOLK *et al.*, 2002).

Em relação a interleucina-21 observou-se que ocorreu baixos níveis de produção desta no grupo dos animais infectados pela linhagem C57 e aumento de produção da citocina IL-27 no grupo dos animais infectados pela linhagem C57. Ambas as citocinas são importantes para o estabelecimento de um perfil Th1. IL-21 tem como finalidade aumentar a proliferação de células T, coordenar a diferenciação de células B e aumentar a atividade citotóxica de células NK, podendo ainda apresentar efeito autócrino na proliferação de células TCD4+ e CD8+ o que parece aumentar a resposta auxiliar Th1 e a atividade de linfócitos T citotóxicos (LEONARD *et al.*, 2005 ; LI *et al.*, 2005 ; LUTHJE *et al.*, 2011 ; ZENG *et al.*, 2005). Enquanto que a IL-27 pode agir de forma sinérgica a IL-12 e principalmente atuando na proliferação de linfócitos T CD8⁺ (GROOT *et al.*, 2012; KAWAKAMI *et al.*, 2004; LUCAS *et al.*, 2003; VILLARINO *et al.*, 2006; WOLK *et al.*, 2002). Estas duas citocinas atuam na proliferação das células T CD8⁺, e como é observado um aumento destas células nos animais infectados com a C57 este fato pode sugerir que a elevação da produção da citocina IL-27 pode suprir a diminuição da IL-21.

9. Conclusões

Levando em consideração os resultados observados nos experimentos estudados, permite-se concluir que:

Verificou-se uma maior frequência de granulomas nos camundongos *BALB/c* infectados experimentalmente com 10^4 /ml da linhagem C57 de *C.pseudotuberculosis* com 70 dias após a infecção, demonstrando, que esta linhagem pode apresentar melhores mecanismos de disseminação pelo hospedeiro. A região mais acometida com a presença de granulomas foi os linfonodos, desta forma, a via linfática demonstra ser a principal via utilizada por este microrganismo para a sua disseminação.

Observou-se um aumento do baço (esplenomegalia) nos camundongos infectados com a linhagem C57 de *C.pseudotuberculosis*, podendo estar relacionado com a maior virulência dessa linhagem, demonstrando o comprometimento da via sanguínea na distribuição deste patógeno.

Os neutrófilos foram às células encontradas em maior número no infiltrado peritoneal nos camundongos *BALB/c* infectados pela linhagem C57, provavelmente estas células podem apresentar uma característica semelhante à observada em macrófagos, que são utilizados pela bactéria para a sua disseminação, este fato pode se correlacionar com a esplenomegalia e um aumento do número de granulomas neste grupo.

Observou-se uma tendência para o aumento da expressão dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ nos animais infectados pela linhagem C57. Este fato pode estar correlacionado com a esplenomegalia, uma vez que a apresentação de antígenos desta bactéria para estas células seriam maiores.

As citocinas do perfil inflamatório (IL-1alfa, IL-6), e regulatório (IL-13 e IL-10) apresentaram diferenças significativas, demonstrando uma tendência para o aumento no grupo dos animais infectados com a linhagem T1, revelando desta forma, que esta linhagem é capaz de ativar a via inflamatória, entretanto, é capaz de ajustar a intensidade desta resposta através do perfil regulatório, este fato pode contribuir para melhor eliminar/conter esta linhagem no hospedeiro.

Observou-se que a avaliação das citocinas TNF- α e IL-17 no homogenato do baço são difíceis de serem padronizadas, uma vez que não foi observado a produção detectável destas citocinas. As citocinas IL-2, IL-4, INF- γ , IL-22, IL-21 e IL-27 não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Referências

ABBAS, A.K.; LINCHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 6ª ed. São Paulo: **Elsevier Science**. 2008.

ABREU, S. R. O. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 502-509, 2008.

ALONSO, J. L. et al. The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. **Research in Veterinary Science**, v. 52, p. 267-279, 1992.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas. **Sociedade Nacional de Agricultura**, v. 100, 1997.

_____. A importância da saúde animal no agronegócio da caprino-ovinocultura. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, 9., 2005, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Federação da Agricultura e Pecuária do Estado do Ceará, 2005. p. 10-22.

_____. et al. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Documentos 74**, Sobral: Embrapa Caprinos, 60p. 2007.

ALVES, M. L. et al. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6 n. 11 jul. 2008.

ALLIE, N. et al. Limited role for lymphotoxin α in the host immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol**, v. 185, p. 4292-4301, 2010.

AMARAL, E. P. et al. Difference in virulence of *Mycobacterium avium* isolates sharing indistinguishable DNA fingerprint determined in murine model of lung infection. **PLoS ONE**. 6(6), 2011.

ANDERSON, D. E.; RINGS, D. M.; PUGH, D. G. Enfermidades do sistema tegumentar. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 232-233, 2005.

ARSENAULT, J. O. et al. Prevalence and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, **Prev. Vet. Med.**, v. 59, p. 67-81, 2003.

ASHFAQ, M. K.; CAMPBELL, S. G. A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. **Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician**, p. 1161- 1165, aug. 1979.

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA**, n. 171, p. 1251-1254, 1977.

BARID, G. J, FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J Comp Pathol.**, v. 137, p. 179-210, 2007.

BAIRD G. J. Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. **Vet Rec.** 140: 611. 1997.

BAIRD G.J, FONTAINE, M.C., *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J Comp Pathol.** 137: 179-210. 2007.

BARGEN, K., WOHLMANN, J., TAYLOR, G.A., UTTERMOHLEN, O., HASS, A. Nitric oxide-mediated intracellular growth restriction of pathogenic *Rhodococcus equi* can be prevented by iron. **Infect immune.** V. 79, n.5, p. 2098-111. 2011.

BASTOS, B. L. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. **J Clin Cell Immunol.**, S4:005. 2012

BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 9, p. 269-272, 1986.

BAYAN, N. et al. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. **Journal of Biotechnology**, v. 104, p. 55-67, 2003.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoide, and peroxinitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**,v. 271: C1424-37, 1996.

BELCHIOR, S.E. et al. Actualizacion sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Rev Vet Argent.** 2006; 23: 258-78.

BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letter.** v. 208, p. 41-45, 2002.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon- γ . **Ann. Rev. Immunol.**, v.15, p.749, 1997.

BOGDAN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C. F.; ELLIS, J. A. Nitric oxide production following *in vitro* stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 56, p. 299-310, 1997.

BOLAND, C.A., MEIJER, W.G. The iron dependent regulatory protein Ider (DtXR) of *Rhodococcus equi*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 191, n. 1, p. 1-5, 2000.

[BRANDÃO, A. P. et al.](#) Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN- γ knockout than IL-12/ β 2-microglobulin double-deficient mice. **Clin. Dev. Immunol.** v. 2012, 2012.

BRASIL. Ministério do planejamento, orçamento e gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas - IBGE. Produção da Pecuária Municipal. v. 35, p.25-26, 2007.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal.** v. 35, p.25-26, 2010.

BROGDEN, K.A.; ENGEN, R.L.; SONGER, J.G. *et al.* Changes in ovine erythrocyte morphology due to sphingomyelin degradation by *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Microbial. Pathogenesis**, v.8, p.157-162, 1990.

BROWN, J.S., OGUNNIYI, A.D., WOODROW, M.C., HOLDEN, D.W., *et al.* Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic streptococcus pneumonia infection. **Infect. Immun**, v.699, p. 6702-6706. 2001b

BULLEN, J.J., ROGERS, H.J., SPALDING, P.B., WARD, C.G. Iron and Infection: The heart of the matter. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 43, p. 325-30. 2005.

BURREL, D.H. Conditions for *in vitro* haemolytic activity by *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Res. Vet. Sci.*, v. 26, p. 333-338, 1979.

BURREL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Aust. Vet. J.**, n. 57, p. 105-110, 1981.

CABRERA, P. A. *et al.* National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants *ovis aries* as an indicator in control programmes in Uruguay. **Acta Trópica**, v. 85, p. 281-285, 2003.

CARMINATI, R. **Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de Linfadenite**

Caseosa em caprinos. 2005. 82f. Dissertação (Mestrado em Imunologia)- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

CARNE, H.R., ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. **Nature**, n. 271, p. 246-248, 1978.

CARTER , N. A. et al. Mice lacking endogenous IL-10- producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with and increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory Tcells. **J. Immunol.**, v. 186, n. 10, p. 5569-79, may 15, 2011.

CHARO IF, RANSOHOFFRM. The many role of chemokines and chemokines receptor in inflammation. **N.Engl J Med.** V.6, p. 610-21, 2006.

CHIRINO-ZARRAGA C., SCARAMELLI, A.; REY VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in **Venezuelan goats flocks. Small Rumin Res.** No prelo. 2005

COLLETTIM, M. G.; BATH, G. F.; CAMERON, C. M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In: **Infection diseases of livestock with special reference to Souther Africa.** Oxford, UK: Oxford University Press v. 2, p. 1385-1387, 1994.

CONLAN, J. W, NORTH, R, J. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. **J. Exp. Med.** Sep 1; v. 174, n. 3, p. 741-744, 1991.

CRONJÉ, L., EDMONDSON, N., EISENACH, K.D., BORNMAN, L. Iron and iron chelating agents modulate *Mycobacterium Tuberculosis* growth and monocyte-macrophage viability and effector functions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 103-12. 2005.

COSTA, M. D. M. et al. Linfadenite caseosa dos caprinos no estado da Bahia. Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador. v 12, n. 1, p. 1-7, 1973.

COSTA SILVA, M. **Avaliação do efeito in vitro de frações de antígenos somáticos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* sobre esplenócitos de camundongos da linhagem CBA.** 2010. 91f. (Mestrado em Imunologia)- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

COSTA LFM. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Rev Cienc Med Biol.** v. 1, p. 105-15. 2002.

COYLE, M.B., LIPSKY, B.A. Coryneform bactéria in infectious diseases: Clinical and Laboratory aspects. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 227-246, 1990.

D'AFONSECA, V.D., MORAES, P.M., DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular*, v.7, p. 252-260.

DIAS, A. S. S. O. et al. Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ucerans*. **Vet. Microbiol.**, v.153, p. 323-331, 2011.
DORELLA, F.A. et al. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7368-7372, 2006a.

DIAS, A.S.S. O., SILVA JR. F.C., SANTOS, L.S., RIBEIRO- CARVALHO, M. M., SABBADINI, P.S., SANTOS, C.S., FILARDY, A.A., MYOSHI, A., AZEVEDO, V.A., HIRATA JR., R., VILLAS-BÔAS, M.H.S., MATTOS-GUARALDI, A.L. Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ucerans*. **Vet. Microbiol**, 153, 323-331, 2011.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**. v. 37, p. 201-218, 2006a.

DUTTA, N.K., MAZUMDAR, K., DASGUPTA, A., DASTIGAR, S.G., Activity of the phenothiazine methdilazine alone or in combination with isoniazid or streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* in mice/ **Journal of Medical Microbiology**.58, 1667-1668, 2009.

EGGLETON, D. G. et al. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Aust. Vet. J.**, n. 68, p. 317-319, 1991.

EHLERS, S. et al. Alphabeta T cell receptor- positive cells and interferon-g, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1847-1859, 2001.

ELLIS JA, HAWK DA, MILLIS KW, PRATT DL. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Vet Immunol Immunopathol**. V.28 p. 303-316, 1991b.

ELLIS, J.A, LAIMORE, M.D., O' TOOLE, D.T., CAMPOS, M. Differential induction of tumor necrosis factor alfa in ovine pulmonary alveolar macrophages following infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella haemolytica*, or lentiviruses. **Infection and immunity**, 3254-3260, 1991.

EUZEBY, J. P. List of bacterial names with standing in Nomenclature, Society for Systematic and Veterinary Bacteriology. Disponível em; < <http://www.bacterio.coct.fr>.> . Acesso em: 06/ 08/ 2005.

FEHLBERG, I. **Estudo da ocorrência de infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e/ou *Mycobacterium* spp em caprinos com suspeita clínica de linfadenite caseosa.** 2010. 81f. **Dissertação (mestrado em imunologia)**- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081-2095, 1989.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G, J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 42-48, 2008.

GASPAR, A.H, *et al.*, Assembly of distinct pilis structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 4, p. 1526- 1533. 2006.

GREEN, S. J.; NACY, C. A.; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens. **J. Leuk. Biol.**, v. 50, p. 93-103, 1991.

GROOT R, VAN BEELEN AJ, BAKDASH G, TAANMAN-KUETER EW, DE JONG EC, KAPSENBERG ML. Viral dsRNA-activated human dendritic cells produce IL-27, which selectively promotes cytotoxicity in naive CD8+ T cells. **J Leukoc Biol.** Jun 13, 2012.

HARD, G.C. Immunity to experimental infection with *Corynebacterium ovis* in the mouse peritoneal cavity. **Res. Vet. Sci.**, v.10, p. 547-554, 1969.

HARD, G.C. Examination by electron micros-copy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. **J. Med. Microbiol** , v.5, p. 483-491,1972.

HASSAN, S.S. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis strain p54B96 isolated from antelope in South Africa obtained by rapid next generation sequencing technology. **Standards in Genomic sciences**, v.7, p.189-199, 2012.

HEINRICHS, J.H., GATLIN, L.E., KUNSCH, C., CHOI, G.H., *et al.* Identification and Characterization of Sir A, an iron-regulated protein from staphylococcus aureus. **J.Bacteriol**, v. 181, p. 1436- 1443.

HENSS, M. et al. Diferential regulation of nitric oxide synthase- 2 and arginase- 1 by type 1/ type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the patter of L- arginine metabolism. **The Journal of immunology**, 2001.

HODGSON, A.L.M., KRYWULT, J., CORNER, L.A., ROTHER, J.S., RADFORD, A.J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infect. Immun**, v.60, p.2900-2905, 1992.

HODGSON, A.L., CARTER, K., TACHEDJIAN, M., KRYWULTI, J., CORNER, L.A., McCOLL, M., CAMERON, A. Efficacy of an ovine caseous lymphaden- itis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Phospholipase D. **Vaccine**, v.17, p. 802-808, 1999.

HOFSTRA, C.L. et al. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE leves. **J. Immunol.**, v. 161, p. 5054-5060, 1998.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária Municipal**, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticias_visualiza.php?id_noticias=1761&id_pagina=1>. Acesso em 19 de set de 2011.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

JANAGAMA, H.K., KUMAR, S., BANNANTINE, J.P., KUGADAS., JAGTAP, P., HIGGINS, L., WITTHUHN, B., SREEVATSAN, S. Iron- Sparing Response of *Mycobacterium ovium* subsp. Paratuberculosis is strain dependent. **BMC Microbiol.**, v. 10, n.1, p. 268. 2010.

JOLLY, R.D. The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. **J. Comp. Path.**, v. 75, p. 417-431, 1965a.

JOLLY, R.D. Some observations on surface lip-ids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*, **J. Appl. Bacteriol.**, v. 29, p. 189-196, 1966.
KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review of Immunology**. v. 11, p. 129-163, 1993.

KAWAKAMI K, KINJO Y, UEZU K, MIYAGI K, KINJO T, YARA S, KOGUCHI Y, MIYAZATO A, SHIBUYA K, IWAKURA Y, TAKEDA K, AKIRA S, SAITO A. Interferon-gamma production and host protective response against Mycobacterium tuberculosis in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. **Microbes Infect.** Apr;6(4):339-49, 2004.

KHADER, S.A.; COOPER, A.M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, Atlanta, v.41, n.2, p.78-83, 2008.

KURIA, J. K., et al. Caseous Lymphadenitis in Goats: The Pathogenesis, Incubation Period and Serological Response after Experimental Infection. **Veterinary Research Communications**, v. 25, p. 89-97, 2001.

LAN, D.T., et al. Role of endogenous tumor necrosis factor alfa and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v.42, p. 868-870, 1998.

LAN, D.T.B; MAKINO, S.I; SHIRAHATA, T. *et al.* Tumor necrosis factor alfa and gama interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **J. Vet. Med. Sci.**, V. 11, p. 1203- 1208, 1999.

_____. LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R.O. In: _____. (Eds.). **Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik**, , München: J.F. Lehmann, 1896.

LEAL I. S., et al. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5747-5754, 1999.

LEONARD WJ, SPOLSKI R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. **Nat Rev Immunol.** Sep;5(9):688-98, 2005.

LIPSKY, B.A., GOLDBERGER, A.C., TOMPKINS, L.S., PLORDE, J.J. Infections caused by non-diphtheria corynebacteria. **Rev. Infect. Dis**, v.4, p. 1220-1235, 1982.

LIU Y, MUNKER S, MÜLLENBACH R, WENG HL. IL-13 Signaling in Liver Fibrogenesis. **Front Immunol**. 3:116. 2012.

LI Y, BLEAKLEY M, YEE C. IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response. **J Immunol**. Aug 15;175(4):2261-9, 2005.

LUCAS S, GHILARDI N, LI J, DE SAUVAGE FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. **Proc Natl Acad Sci**. Dec 9;100(25):15047-52, 2003.

LÜTHJE, K., KALLIES, A., SHIMOHAKAMADA, Y., BELZ, G. T., LIGHT, A., TARLINTON, D. M., NUTT, S. L., The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. **Nature Immunology**. 13(5), 491-499, 2011.

MACHADO, P. R. L., et al. Mecanismos de resposta imune ás infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MAURER, A.P., MEHLITZ, A., MOLLENKOPF, H.J., MEYER, T.F. Gene expression profiles of chlamydomyces pneumonia during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence. **PLoS Pathog**, v.6, p. 83-89, 2007.

MCFARLANE E, CARTER KC, MCKENZIE AN, KAYE PM, BROMBACHER F, ALEXANDER J. Endogenous IL-13 plays a crucial role in liver granuloma maturation during Leishmania donovani infection, independent of IL-4R α -responsive macrophages and neutrophils. **J Infect Dis**. Jul 1;204(1):36-43, 2011.

McINNIS, A.; RENNICK, D. M. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. **J. Exp. Med**. v.167, n.2, p. 598-611, 1988.

McNAMARA, P.J., CUEVAS, W.A., SONGER, J. G., Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanbacterium haemolyticum*: Cloning sequence homology. **Gene**, v. 156: 113-118.

MEYER, R. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: Aspectos da prevalência, da imunidade e do imunodiagnóstico. Tese (Doutorado em Imunologia)**- Instituto de Ciências da saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil, Salvador, p.83, 2004.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V. *et al.* In vitro INF-gama production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Vet. Immunol. And Immunoptology**. V.107, p.249-254, 2005.

_____. *et al.* In vitro INF-gama production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Vet. Immunol. And Immunopathol.**, v.107, v. 3-4, p. 249-54, 2005.

MOLLER, K., *et al.* Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. **J. Vet Med. B. Infect. Dis. Vet.Pub. Health**, v.47, n. 1, p. 55-62, 2000.

MOORE, K.W.*et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**v.19, p. 683-765, 2001.

MOTTA, R. G.; CREMASCO, A. C. M; RIBEIRO, M. G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Vet. Zootec.**, p. 200-212, 2010.

MOSSER, D. M.,; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 958-69, 2008.

MOTOMURA, Y. *et al.* The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ Tcells. **Nat. Immunol.**, v.12, n. 5, p. 450-9, 2011.

MOURA-COSTA, L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 1, n.1, p. 105-115, 2002.

MOURA-COSTA, L.; BAHIA, R.; VALE, V.; PAULE, B.; PORTELA, R.; FREIRE, S.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R; BARRETO, L.; MEYER,R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé Goats and their potential protection against caseous

lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n.3, p. 413-15, 2008.

MUCKLE, C.A., GYLES, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Can. J. Comp. Med.**, v. 46, p. 206-208, 1982.

MURPHY, E. A., SATHIYASSELAN, J., PARENT, M. A., ZOU, B., BALDWIN, C. L., Interferon- γ is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible Balb/c mice. **Immunology**. 103, 511-518, 2001.

MURRAY HW, TSAI CW, LIU J, MA X. Visceral Leishmania donovani infection in interleukin-13-/- mice. **Infect Immun**; 74:2487–90, 2006.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. Corynebacterium pseudotuberculosis infection of sheep: role of skin lesions and dipping fluids. **Aust. Vet. J.**, n.50, p. 537-542, 1974.

NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian host and microbial pathogens. **PNAS**. v.97, n. 16, p.8841-8848, 2000.

NELMS, K.; KEEGAN, A.D.; ZAMORANOC, J; RYAN, J.J.; PAUL, W.E. The IL-4 Receptor: Signaling Mechanisms and Biologic functions. **Annu.Rev.Immunol.**, v.17,p.701-738, 1999

NIETO, N.C., FOLEY, J.G., MACLACHLAN, N, N.J., YUANT, T., SPIER, S.J. Evaluation of hepatic disease in mice following intradermal inoculation with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research** 70 (2), 257-262, 2009.

NOCARD, E. **Annales de l' Institut Pasteur**, 10, 699. 1898

NOLL, A.; AUTENRIETH, I. B. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2955-2961, 1996.

OOGAI, Y., MATSUO, M., HASHIMOTO, M., KATO, F., SUGAI, M., KOMATSUZAWA, H. Expression of virulence Factors by *Staphylococcus aureus* Grown in Serum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 8097-8105. 2011

OKAMOTO YOSHIDA *et al.* Essential role of IL-17 in the formation of a mycobacterial infection- induced granuloma in the lung. **The journal of immunology**, Bethesda, v. 184, n.8, p. 4414-4422, 2010.

OSWALD, I. P. *et al.* Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a costimulatory factor for interferon γ - induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 8676-8680, 1992.

PACHECO A.S. **Estudo de Aspectos da Resposta Imune em Camundongos CBA infectados com as linhagens T1 e VD57 de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências da Saúde, 2009.

PARADKAR, P. N., DOMINICO, I.D., DURCHFORT, N., ZOHAN, I., KAPLAN, J., WARD, D.M. Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages. **Blood.**, v. 112, p. 866-874. 2008.

PATON, M.W.*et al.* Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccine in sheep flocks. **Aust. Vet. J.**, v. 81, p. 91-95, 2003.

PAULE, B.J.A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L.F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C.R.; VALE, V.L.C.; MOURA-COSTA, L.F.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: Kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 129- 139, 2003

PAULE ,B. J. *et al.* SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 3, n.1, p. 44-52, 2004.

PEDRAL,G. Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C.pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde-UFBA, 2012.

PEKELDER, J. J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. **Diseases of Sheep**. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 270-274. 2000

PÉPIN, M.; FONTAINE, J.J.; PARDON, P. *et al.* Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Vet. Microbiol.**, V.29, p. 123-134, 1991.

PÉPIN, M. et al. Ovine mononuclear phagocytes in situ: identification by monoclonal antibodies and involvement in experimental pyogranulomas. **J. Leukoc Biol.**, v 51, n. 2, p. 188-98, 1992.

PÉPIN, M.; PATON, M.; HODGSON, A.L. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Sheep. **Current Topics in Veterinary Research**, v.1, p.63-82, 1994.

PÉPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; ROTHER, J.S.; HODGSON, A.L.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet Res.**, V.28, p. 1491, 1997.

_____.; PATON, M.; HODGSON, A. L. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Sheep. **Current Topics in Veterinary Research**, v.1, p. 63-82, 1994.

PEKELDER, J.J. Caseous lymphadenitis in: MARTIN, W.B.; AITEKEN, I.D. **Diseases of sheep**. 3.ed. Iowa: Blackwell publishing. P. 270-274. 2000.

PERRY, L. L.; FEILZER, K.; CALDWELL, H. D. Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through INF- gamma-dependent and- independent pathways. **J. Immun.**, v. 158, n. 7, p. 3344-3352, 1997.

PESTKA , S. et al. Interleucina- 10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.22, p. 29-70, 2004.

PIONTKOWSKI, M. D.; SHIVVERS, D.W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 212, p. 1765-1768, 1998.

PUECH, V. et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria : importance of the non- covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. **Microbiology**. v. 147, p. 1365- 1382, 2001.

PRICE, A.E., LIANG, H., SULLIVAN, B. M., REINHARDT, R.L., EISLEY, C.J., ERLE, D.J., LOCKSLEY, R.M., Systematically dispersed innate IL-13- expressing cells in type 2 immunity. **PNAS**. 107 (25), 11489-11494, 2010.

RADOSTITS, O. M. et al. Doenças causadas por bactérias. In: _____. **Clínica veterinária**: um tratado de doença dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 653-656.

RADOSTITS, O. M., et al. Caseous Lymphadenitis in sheep and goat. In: **Veterinary Medicine**: textbook of the diseases of catlee, sheep, pigs, goats and horses. 9th ed. Philadelphia: Bailliere Tindall, 2007. P. 830-9.

REIMAN, R. M., THOMPSON, R. W., FENG, C. G., HARI, D., KNIGHT, R., CHEEVER, A. W., ROSEMBERG, H. F., WYNN, T. A., Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect. Immun.** 74(3), 1471-1479, 2006.

RIET-CORREA, F. et al. Doenças de Ruminantes e Equinos. São Paulo: Varela, p. 284-287, 2001.

RIET-CORREA F. et al.. Doenças de ruminantes e equídeos. 2^a ed. São Paulo: Varela; 2007.

RIBEIRO, O. C. et al. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 8, n.1/2 , p. 27-29, 1988.

RODRIGUEZ, G.M., SMITH, I. Identification of na ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium Tuberculosis*. **J Bacteriol.**, v. 188, n. 2, p. 424-30. 2006.

ROGERS HW, UNANUE ER. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. **Infect Immun.**, v. 61, n. 12, p. 5090-5096, 1993.

ROJAS, M. et al. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 6122-6131, 1999.

SOARES, A. T.; VIANA, J. A.; LEMOS, P. F. B. A. Recomendações Técnicas para Produção de Caprinos e Ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.1, n. 2, p.45-51, 2007.

SONGER, J.G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M.M.; et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, p. 223-226, 1988.

SCHMITT, M.P. Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheria*. Identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme

oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 838-845. 1977.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. Caseous Lymphadenitis. In **Goat Medicine**. Lea & Febier, p. 47-61, 1994.

SHITH, M. C.; SHERMAN, D. Caseous Lymphadenitis: an increasing cause for concern. **Veterinary Record**, 140, 635. 1997.

SILVA, A. et al. Complete Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Cp31, isolated from an Egyptian Buffalo. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6663-6664, 2012.

SOUZA, AP. Estudo de aspecto da resposta immune em camundongos CBA infectados com as cepas T1 e VD57 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Dissertação de mestrado em programa de Pós- Graduação em imunologia- Universidade Federal da Bahia- 2009.

SJÖSTED, T. A.; CONLAN, J. W.; NORTH, R. J. Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice and participate in defense against reinfection. **Infect Immun**. v. 62, n. 7, p. 2779-2783, 1994.

TASHJIAN, J.J.; CAMPBELL, S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: An electron microscopic study. **Am.J.Vet. Res.**, V. 44, p. 690-693, 1983.

TRINCHIERI, G. Regulatory role of cells producing both interferon- γ and interleukin 10 in persistent infection. **J. Exp.Med.**, v.194, n.19, 2001.

VALE,V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; PAULE, B.; R.CARMINATI; R. BAHIA; MOURA-COSTA L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Rev. Ciên.Méd. Biol.**, V.2, n.2, p.192-200, 2003.

VALE, V. L.C. Avaliação de Aspectos da Resposta Imune de Camundongos Balb/C contra linhagem T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Tese de Doutorado** em Programa de Pós |Graduação em Imunologia- Universidade Federal da Bahia, 2005.

VILLARINO AV, STUMHOFER JS, SARIS CJ, KASTELEIN RA, DE SAUVAGE FJ, HUNTER CA. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. **J Immunol.** Jan 1;176(1):237-47, 2006.

WALBURGER, A. *et al.*, Protein kinase G from pathogenic Mycobacteria promotes survival within macrophages. **Science.**, v.304, p. 1800, 2004.

WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. **NATURE** v.4, 2004.

WILLIAMSON, L.H. Caseous Lymphadenitis in Small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.17, n.2, p. 359-371, 2001.

WINDSOR, P. A. Control of caseous lymphadenitis. **Vet. Clin. Food. Anim.**, v. 27, 193- 202, 2011.

WOLK, K., KUNZ, S., ASADULLAH, K., and SABAT, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? (2002).

WYNN TA. IL-13 effector functions. **Annu Rev Immunol** 21: 425-456, 2003.

WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. **NATURE** v.4, 2004.

WYNNIT. Fibrotic disease and Th1/ Th2 paradigm. **NATURE** v.4, 2004. Disponível em : < <http://www.Ncbi.Nlm.Nih.gov/Pubmed/15286725>>. Acesso em : 26 de Ago de 2011.

ZENG R, SPOLSKI R, FINKELSTEIN SE, OH S, KOVANEN PE, HINRICHS CS, PISE-MASISON CA, RADONOVICH MF, BRADY JN, RESTIFO NP, BERZOFKY JA, LEONARD WJ. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. **J Exp Med.** Jan 3;201(1):139-48, 2005.

ZUBER, B. *et al.* Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. **Journal of Bacteriology.** v. 190, n. 16, p. 5672-5680, 2008.

