

1. INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa é uma doença crônica infecciosa de pequenos ruminantes, caprinos e ovinos, cujo agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, coco-bacilo Gram positivo, patógeno intracelular facultativo de fagócitos, relacionado filogeneticamente ao *Mycobacterium tuberculosis* (BATEY, 1986a; PASCUAL *et al.*, 1995). O principal fator de virulência é uma exotoxina, que é uma fosfolipase D (HODGSON, 1999).

A transmissão da doença ocorre principalmente através da pele ferida, mas também pelo aleitamento por fêmeas contaminadas e por aerossóis (BATEY, 1996b). A bactéria, ao penetrar no organismo do hospedeiro é carregada pela vias linfáticas aferentes para os linfonodos superficiais e drenantes, onde granulomas característicos são produzidos. Os linfonodos mais acometidos são pré-escapular, parotídeo, submandibular, supramamário e poplíteo (UNANIAN *et al.* 1985; BROWN, OLANDER e ALVES, 1987). A enfermidade resulta na diminuição da produção de carne, leite, desvalorização da pele e aumento do custo de mão-de-obra destinado ao tratamento das lesões superficiais (ALVES E OLANDER, 1999).

A imunidade contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* envolve tanto aspectos da imunidade celular quanto da imunidade humoral e embora esta última seja intensa, sozinha é incapaz de debelar a infecção (BATEY, 1986a; VALE *et al.*, 2003).

As proteínas secretadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* têm demonstrado exercer um papel fundamental na indução de uma resposta celular protetora (BURRELLS *et al.*, 1995). Segundo Andersen *et al.* (1991), o crescimento de *M. tuberculosis* resulta na liberação de proteínas excretadas no meio, ativamente liberadas, nos primeiros dias da cultura.

Em seguida são liberadas proteínas secretadas que atravessam a membrana citoplasmática e se localizam externamente à parede celular, sendo liberadas gradualmente durante o crescimento bacteriano. Kaufmann e Hess (1999) sugeriram que antígenos secretados de *M. tuberculosis*, seriam mais eficazes que os antígenos somáticos para compor uma vacina e para utilização em testes diagnósticos para bactérias intracelulares.

Foram identificadas algumas moléculas secretadas por este microrganismo, principalmente obtidas pela combinação de três processos de extração e de purificação de macromoléculas (PAULE, B *et al.*, 2004a). Dentre tais frações, destacaram-se aquela designada por Q5, com banda imunodominante com cerca de 21 KDa de peso molecular reconhecida através do *western blotting*. O estudo destas frações tem sido dificultado pela pequena proporção representada pelas mesmas em relação ao conteúdo total excretado/secretado por *C. pseudotuberculosis*.

Estudos têm demonstrado a importância de citocinas no combate a *Corynebacterium pseudotuberculosis* (LAN *et al.*, 1998). A IL-12 é conhecida pela capacidade indutora do perfil Th1, na estimulação de TNF- α e INF- γ por células CD4+, CD8+, NK e macrófagos (TRINCHIERI, G. E SCOOT, P., 1995). A IL-10 e a IL-4 são citocinas do perfil Th2, possuindo um caráter antiinflamatório (ABBAS, LINCHTMAN E PROBER, 2005). No entanto, a IL-10 pode também ser produzida por células Th1 atuando como uma citocina regulatória ao impedir a exacerbação de uma resposta inflamatória danosa ao hospedeiro (TRINCHIERI, 2001). Esta citocina imunomoduladora bloqueia a ação ou produção de IL-12, TNF- α , INF- γ , IL-4 e GM-CSF e a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e MHC classe II, limitando a magnitude de ativação e efeitos das citocinas liberadas por células T durante a resposta imune específica (PESTAKA *et al.*, 2004).

A imunidade humoral também é importante no combate a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, pois possivelmente dentre outras moléculas, a sua exotoxina, que pode ser neutralizada por anticorpos, é de fundamental importância para a sua disseminação no hospedeiro (BATEY, 1986a).

Tendo em vista a limitação de abordagem experimental no modelo caprino ou ovino pela inexistência de reagentes que possibilitem um estudo mais detalhado da resposta imune celular nestes animais, o presente trabalho se propõe a estudar o papel de algumas citocinas e da resposta por anticorpos da classe IgG e suas subclasses, na infecção experimental murina, utilizando-se duas linhagens bacterianas, uma atenuada e outra virulenta, bem como o antígeno secretado total e sua fração antigênica Q5, anteriormente mencionada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A DOENÇA

A linfadenite caseosa é uma doença infecto-contagiosa crônica, cujo agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Esta doença acomete principalmente caprinos e ovinos, podendo afetar eqüinos e bovinos (nestes casos, geralmente não como uma linfadenite), e ainda, como doença ocupacional, atingir seres humanos (BENHAM *et al.*, 1962; CAMERON E MINNAR, 1969; LOPEZ *et al.*, 1966; BATTEY E TONGE, 1968; BATEY, 1986a; PEEL *et al.*, 1997). No nordeste brasileiro existe uma alta prevalência de linfadenite caseosa nos rebanhos de caprinos, resultando em graves prejuízos econômicos para esta região (MOURA COSTA *et al.*, 1973; COSTA FILHO, 1974; UNANIAN *et al.*, 1985; BROWN *et al.*, 1987; RIBEIRO *et al.*, 1988).

A doença caracteriza-se por um quadro de granulomas nos linfonodos, com material necrótico de cor esbranquiçada (AYERS, 1977), que não leva à morte, mas compromete o seu desempenho, uma vez que resulta em redução do peso e da produção do leite, causa danos à pele, dificulta a comercialização da carcaça, podendo comprometer exportação e importação de animais (UNANIAN *et al.*, 1985; RIBEIRO *et al.*, 1988; ALVES e OLANDER, 1999). O tratamento com antibióticos é dificultado pelo fato de drogas não penetrarem nos granulomas, não atingindo níveis bactericidas. A drenagem dos granulomas superficiais leva a contaminação da pele e do ambiente, facilitando a disseminação (NAIRN e ROBERTSON, 1974). Os granulomas internos são de difícil diagnóstico podendo constituir focos de disseminação da doença (ELLIS *et al.*, 1987).

2.2. O AGENTE ETIOLÓGICO

2.2.1. Taxonomia

Nocard *et al.* (1888), isolou uma bactéria de afecção nodular subcutânea de bovino que era compatível com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Em 1891, Preisz e Guinard isolaram um germe similar de um abscesso renal de ovelhas. Novamente Nocard em 1893, isolou o mesmo microorganismo a partir de uma enfermidade cutânea similar ao mormo, em eqüinos. Preisz em 1894 descreveu melhor o agente, comparando-o com o bacilo diftérico, denominando-o *Bacillus pseudotuberculosis ovis*. A Sociedade Americana de Bacteriologia, no ano de 1923, passou a adotar a expressão *Corynebacterium* como nome do gênero, sendo o microorganismo renomeado *Corynebacterium ovis*. A partir da sexta edição do Manual Berguey em 1948, passou-se adotar a denominação atual de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BENHAM, SEAMAN e WOODBINE, 1962; MERCHANT e PACKER, 1975; CORRÊA e CORRÊA, 1992).

O gênero *Corynebacterium* pertence à família *Actinomycetae*, assim como os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Os resultados de hibridização DNA-DNA, assim como o estudo da seqüência do RNA ribossômico, mostram que *Corynebacterium pseudotuberculosis* pertence ao mesmo grupo de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (TAKAHASHI *et al.*, 1997).

2.2.2. Características morfológicas, tintórias, bioquímicas e de crescimento

O agente etiológico da linfadenite caseosa, a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, caracteriza-se como um bacilo Gram-positivo, medindo 0,5 a 0,6 µm por 1 a 3 µm, podendo apresentar forma cocóide. Pode se apresentar isolado ou formando grupamentos irregulares. São bacilos imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e não esporulados (BATEY, 1986b; MERCHANT & PACKER, 1975; QUINN *et al.*, 1994).

C. pseudotuberculosis também é caracterizado por provas bioquímicas tais como: produção de catalase, produção de urease, redução de nitrato a nitrito e fermentação de carboidratos, sem produção de gás como maltose, manose, glicose, algumas linhagens fermentam a galactose (MUCLKE & GYLES, 1982; SONGER *et al.*, 1988). Não tem atividade proteolítica, não hidrolisando a gelatina nem digerindo a caseína (MERCHANT & PACKER, 1975; QUINN *et al.*, 1994). De acordo com Songer *et al.* (1988) a variabilidade nas características bioquímicas, particularmente quanto à fermentação de carboidratos, pode ser atribuída à existência de biovars entre as espécies e o uso de diferentes métodos por diferentes pesquisadores. *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria mesofílica, cuja temperatura ideal de crescimento é 37°C e o pH ideal está entre 7,0 e 7,2 (MERCHANT & PACKER, 1975).

Este microorganismo é exigente do ponto de vista nutricional, crescendo bem em meios enriquecidos como ágar sangue, ágar BHI ou caldo BHI ou meios enriquecidos com soro animal. O crescimento bacteriano em meio líquido ocorre como uma película na superfície, sem turvação do meio, que pode ser desfeita pela agitação formando-se flocos que precipitam (MERCHANT & PACKER, 1975; MUCLKE & GYLES, 1982). A película é

atribuída aos lipídeos de superfície e a formação de uma película mais densa foi atribuída a uma maior virulência (JOLLY, 1966).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Apesar do processo patogênico provocado por *C. pseudotuberculosis* não estar completamente definido, três fatores de virulência foram identificados, a exotoxina fosfolipase D, lipídeos de parede (WALKER *et al.*, 1994; PEPIN *et al.*, 1999) e as proteínas ligadas ao metabolismo do ferro (BILLINGTON *et al.*, 2002).

2.3.1. Lipídeos de Parede

Segundo Jolly (1966), a presença desta camada lipídica dificulta a fagocitose da bactéria, aumentando sua virulência, enquanto que para Batey (1986a) e Songer *et al.* (1990), esta substância está relacionada à citotoxicidade.

Uma relação entre virulência e quantidade de lipídeos na parede de *C. pseudotuberculosis* foi demonstrada em infecções experimentais, tanto em camundongos como em ovinos (BURREL, 1978; MUCLKE e GYLES, 1983). Nos dois casos houve alta relação entre conteúdo lipídico das linhagens testadas e sua capacidade de formar granulomas. Os lipídeos celulares das bactérias têm características patogênicas e este fator de virulência está associado à formação de granulomas (WILLIAMSON, 2001).

2.3.2. Exotoxina

A fosfolipase D é uma proteína catiônica de 31 kDa capaz de hidrolizar a esfingomielina, um importante componente de membrana citoplasmática, em colina e fosfato de ceramida (JOLLY, 1965b; CARNE E ONON, 1978). Enquanto a colina é liberada, o fosfato de ceramida fica associado à membrana. Esta ação da fosfolipase D compromete as células do epitélio vascular, aumentando a permeabilidade e favorecendo a disseminação do microorganismo a partir do local inicial da infecção (CARNE e ONON, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983).

Sua capacidade de lisar eritrócitos de carneiro em sinergismo com as enzimas colesterol oxidase e a fosfolipase C produzidas por *Rhodococcus equi*, decorre da ação da fosfolipase D sobre a esfingomielina produzindo colina e fosfato de ceramida. Este, por sua vez, sofre a ação da fosfolipase C de *Rhodococcus equi*, produzindo ceramida. A degradação de esfingomielina a ceramida resulta em lise celular (BROWN e OLANDER, 1987)

As propriedades de hemólise em sinergia com a colesterol-oxidase e a fosfolipase C de *Rhodococcus equi* e a capacidade de resistência à hemólise pela toxina beta estafilocócica (BURRELL, 1979; SONGER, 1997, SONGER *et al.*, 1988), permitiram a elaboração de dois testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-exotoxina (teste da inibição da ação anti-hemolisina e teste da inibição da hemólise sinérgica), além do teste para dosagem da exotoxina no sobrenadante de cultura (ZAKI, 1968; KNIGHT, 1978). Estas atividades enzimáticas foram relacionadas com a toxicidade da fosfolipase D em camundongos (SUTHERLAND E SPEIJERS, 1989).

2.3.3. Proteínas ligadas ao metabolismo do ferro

O papel de genes *Fag A, B, C e D* de *C. pseudotuberculosis*, tem sido objeto de estudo (BILLINGTON *et al.*, 2002). Tais genes, que codificam proteínas similares às proteínas de outras bactérias intracelulares que retiram ferro do hospedeiro (GRIFFITHS, 1990), contribuem para aumentar a virulência deste microrganismo, pois ao serem construídos mutantes desses genes, observou-se que particularmente o gene mutante do *Fag B* diminuía a virulência dessa bactéria em caprinos.

2.4 ANTÍGENOS DE *C. PSEUDOTUBERCULOSIS*

Os antígenos utilizados nas pesquisas até hoje são geralmente obtidos da lise bacteriana, inativação da célula inteira ou utilização direta do sobrenadante de cultura. A identificação de moléculas antigênicas reconhecidas por anticorpos em estudos sorológicos, principalmente pelo ELISA e “Western blotting”, tem demonstrado aspectos importantes da cinética da infecção (VALE, 2001).

Meyer *et al.* (2005) avaliaram a produção de IFN- γ pelas células sangüíneas de caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis*, em resposta aos antígenos, somático e secretado desta referida bactéria, de modo a avaliar a resposta imune celular. Os resultados mostraram uma significativa diferença entre os dois antígenos. O antígeno somático induziu baixa produção de IFN- γ nos animais infectados e sadios, ao passo que o antígeno secretado induziu alta produção de IFN- γ apenas nos animais infectados. Diversos estudos têm demonstrado que as

proteínas secretadas são as candidatas mais promissoras para o desenvolvimento de vacinas (HORWITZ, 2000).

Walker *et al.* (1994) pesquisaram novos antígenos capazes de conferirem proteção contra a linfadenite caseosa pela utilização de sondas de células secretoras de anticorpos. Seus resultados sugerem que os antígenos secretados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* podem ser os responsáveis pela indução de uma resposta celular protetora.

Além da fosfolipase D, outros antígenos secretados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* têm sido estudados. Walker *et al.* (1994), identificaram o antígeno CP 40, que como o próprio nome sugere é um antígeno de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de 40 KDa. Este antígeno ao ser utilizado como vacina em ovelhas, conferiu uma redução de 82% na proporção de ovelhas infectadas. Este nível de proteção é bastante favorável quando comparado com o obtido com as vacinas comerciais.

Vale (2005) produziu anticorpos monoclonais contra frações do antígeno secretado. A análise por meio de “Western blotting” de antígeno somático e secretado, evidenciou o reconhecimento de uma fração protéica de 75 KDa por anticorpo monoclonal do isotipo IgG1. Esta molécula, por ser reconhecida tanto no antígeno somático quanto no secretado, supõe-se que ela seja uma molécula inicialmente ancorada à membrana e que depois é secretada. Além disso, o tratamento de camundongos com anticorpos monoclonais contra a fração de 75 KDa conferiu a eles uma proteção significativa contra um desafio com 10^4 UFC de uma linhagem virulenta de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, demonstrado pelo aumento na sobrevivência dos camundongos tratados em relação aos animais do grupo controle.

Ellis *et al.* (1991a) ao estudarem os antígenos ligados à bactéria, através da mesma técnica, avaliaram soros de ovinos naturalmente infectados utilizando como antígeno as

proteínas extraídas do sonicado da cultura, encontrando onze antígenos com os referidos pesos moleculares: 20 KDa, 22,4 KDa, 31,6 KDa, 35,5 KDa, 36,3 KDa, 39,8 KDa, 45,7 KDa, 56,2 KDa, 63,1 KDa, 79,4 KDa e 100 KDa.

Usando o concentrado do sobrenadante da cultura, foram observados neste estudo, antígenos com pesos moleculares da ordem de 20 KDa, 25,1 KDa, 31,6 KDa, 39,8 KDa e 63,1 KDa. Entre 8 a 11 antígenos com pesos variando entre 16 e 125 KDa (16, 20, 27, 30, 36, 40, 43, 58, 64, 68 e 125 KDa) foram reconhecidos por animais infectados usando-se como antígeno o sobrenadante da cultura concentrado pela técnica de TPP (PAULE *et al.*, 2004b). As funções biológicas e a relevância imunológica destas proteínas ainda não foram esclarecidas.

2.5. TRANSMISSÃO E SINAIS CLÍNICOS

A transmissão de *Corynebacterium pseudotuberculosis* ocorre pelo contato do animal sadio com elementos contaminados do meio ambiente, e outros animais doentes com granulomas superficiais ou pulmonares com exsudação (ELLIS *et al.*, 1987), instrumentos ou soluções de banho, o solo ou a vegetação, bem como as fezes de animais infectados (CARNE, 1932; NAIRN E ROBERTSON, 1974). Segundo Augustine e Renshaw (1986) esta bactéria sobrevive até oito semanas no meio ambiente sem, no entanto, se multiplicar. A persistência deste microorganismo no ambiente parece ser o principal fator responsável pela sua transmissão no rebanho.

A infecção normalmente ocorre por meio da pele ou ferimentos na membrana mucosa, seguida pela disseminação da bactéria para os linfonodos superficiais, nos quais os abscessos

caseosos se desenvolvem e ocorre a necrose. A disseminação da bactéria também pode atingir os órgãos viscerais, particularmente os pulmões (BATEY, 1986a). A invasão de órgãos internos pode ocorrer pela passagem da mucosa vaginal ou digestiva e pela liberação do patógeno na corrente sanguínea (BROGDEN *et al.*, 1984a, CAMERON, 1972a). A localização dos granulomas depende, principalmente, da via de entrada do microrganismo, que por sua vez está diretamente relacionada ao sistema de manejo utilizado (VALE, 2005).

O padrão de distribuição dos abscessos no corpo (principalmente na região anterior) e o fato de que boa parte desses abscessos continha *C. pseudotuberculosis* indica que a infecção através da pele pode ser importante nos caprinos do nordeste brasileiro devido ao tipo de exploração extensiva em pastagens com vegetação espinhosa. Além disso, uma baixa incidência de abscessos pulmonares e mediastinais quando comparado com os abscessos cutâneos, além da ausência de abscessos nos linfonodos mesentéricos sugerem que os tratos, respiratório e digestório são uma rota menos importante de infecção no manejo extensivo (UNANIAN, SILVA E PANT, 1985).

O desenvolvimento simultâneo de lesões pulmonares pode ser devido à disseminação da bactéria por via hematogênica. A bactéria penetra a partir de lesões na pele podendo atingir a circulação linfática ou venosa e assim chegar aos pulmões pela artéria pulmonar (NAIRN E ROBERTSON, 1974). No entanto, Ellis *et al.* (1987) demonstraram que *Corynebacterium pseudotuberculosis* é capaz de penetrar nos pulmões do hospedeiro por inalação, podendo ainda ser inoculado na forma de aerossóis oriundos de animais com infecções pulmonares para a pele lesada de animais recentemente tosados (PATON *et al.*, 1995).

O contato ou mesmo o consumo da vegetação nativa contaminada, que é espinhosa e traumática para a pele e mucosa oral, pode desempenhar um papel importante na transmissão da linfadenite caseosa no nordeste brasileiro (MEYER, 2003).

Os sinais clínicos e lesões podem não ser observados até muitos meses após o início da infecção. A doença se manifesta de duas formas: a linfadenite caseosa externa (abscessos nos linfonodos superficiais e tecidos subcutâneos) e a linfadenite caseosa interna (abscessos localizados internamente nos órgãos e linfonodos, especialmente os pulmões, fígado, rins, e linfonodos mediastinal, bronquial e lombar). Ambas as formas podem se desenvolver simultaneamente (BATEY, 1986a). A linfadenite caseosa interna pode causar diminuição da fertilidade, emagrecimento gradual e pode ser responsável por condenação da carcaça na hora do abate. A linfadenite caseosa externa pode causar a ruptura de abscessos e a contaminação do meio ambiente, além de permitir a introdução de microrganismos causadores desta doença em animais saudáveis e levar à depreciação no valor das peles devido às lesões causadas pela ruptura desses abscessos (BATEY *et al.*, 1986b).

2.6. PREVALÊNCIA DA LINFADENITE CASEOSA

A alta incidência da linfadenite caseosa no nordeste do Brasil se deve ao tipo de vegetação encontrada, a caatinga, a qual é caracterizada por arbustos espinhosos e pequenas árvores (UNANIAN, SILVA e PANT, 1985).

Os mais recentes registros de prevalência foram apresentados por Meyer (2003), que estudou a soro prevalência desta zoonose no semi-árido baiano, obtendo um percentual médio de 46,66%. Entretanto, dentre as três microrregiões estudadas, Baixo e Médio São Francisco

evidenciaram prevalência de 58,01%, Piemonte da Diamantina, e a microrregião Nordeste apresentaram prevalências de 37,76% e 31,67%, respectivamente. O autor acredita que as variações percentuais apresentam um comportamento relativamente homogêneo, quando se leva em conta a mesma região, e que provavelmente, estas diferenças nos percentuais estejam relacionadas com o tamanho da população caprina e com as densidades populacionais, que são maiores na região do Baixo e Médio São Francisco.

O *C. pseudotuberculosis* está muito difundido pelo mundo, principalmente em alguns países como Austrália, Argentina, Nova Zelândia, África do Sul e regiões ocidentais dos Estados Unidos, onde há uma grande criação de ovinos (MERCHANT E PACKHER, 1980). Foi descrita também em países que possuem significativa população de caprinos e ovinos como: Grã-Bretanha, Noruega, Holanda e Brasil (ANDERSON E NAIRN, 1984), Egito, Índia, Turquia, Sudão, França e Canadá (BATEY *et al.*, 1986b).

A cronicidade da patogenia associada à sintomatologia pouco específica, bem como a presença de outros agentes etiológicos, responsáveis também pela formação de piogranulomas, como *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp* tem contribuído para disseminação da enfermidade. Contudo, a maioria dos inquéritos epidemiológicos baseia-se em animais provenientes de abatedouros, o que pode ocasionar uma redução do número dos animais clinicamente doentes (UNANIAN *et al.* 1985)

2.7. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A forma visceral (abscessos nos órgãos internos) é a causa da significativa perda econômica na indústria de caprinos e ovinos devido à condenação de carcaças. A forma superficial

(abscessos nos linfonodos periféricos) leva à formação de cicatrizes que desvalorizam a pele. Outras causas de perdas econômicas incluem desvalorização do produto devido à redução no ganho de peso e da produção de lã, além da redução na produção de leite e da eficiência reprodutiva (PATON, 1997).

No nordeste brasileiro, onde a venda de pele é uma importante fonte de renda para o pequeno produtor local, estimou-se que a presença de defeitos superficiais reduziria o valor mercadológico das peles em até 40% (FIGUEIREDO *et al.*, 1982). Esta região concentra aproximadamente 90% do rebanho caprino e 40% do rebanho ovino nacional, sendo que a estimativa é que a maioria dos rebanhos está infectada e que a prevalência clínica atinge até 30% dos animais (COSTA *et al.*, 1974).

Moura-Costa e outros (1973) estudaram a distribuição geográfica da linfadenite caseosa nos rebanhos caprinos no estado da Bahia e relataram que a doença estava presente particularmente no norte do estado. Recentemente, em um estudo sorológico também na Bahia, demonstrou-se a presença de anticorpos séricos contra *C. pseudotuberculosis* em 46,6% dos caprinos estudados (MEYER, 2003).

2.8. IMUNIDADE

Nos primeiro estágios pós-infecção, os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas na resposta contra *C. pseudotuberculosis* (JOLLY, 1965a, HARD, 1969). A presença destes tipos celulares foi demonstrada como crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e também secundária (LAN *et al.* 1999).

A incapacidade do macrófago em eliminar o agente patogênico pode ser atribuída à ausência de produção do óxido nítrico quando submetidos à estimulação com antígenos de *C. pseudotuberculosis*, como sugeriram os estudos de Bogden *et al.* (1990), com macrófagos pulmonares ovinos. Considerando a importância do óxido nítrico na eliminação de patógenos intracelulares, a não produção deste agente em resposta aos componentes bacterianos explicaria o desenvolvimento de infecções exclusivamente crônicas observadas em pequenos ruminantes (GREEN *et al.*, 1991).

Lan *et al.* (1999), investigaram o papel do receptor de complemento do tipo 3 (CR3), na defesa primária e secundária do hospedeiro contra *C. pseudotuberculosis*. Este receptor é expresso por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B e desempenham papel chave na adesão, extravasamento, migração e fagocitose. O tratamento de camundongos com anticorpo monoclonal anti-CR3, resultou em multiplicação da bactéria nos órgãos e aumento da mortalidade nos animais infectados.

Por apresentar um largo espectro de proteínas secretadas/excretadas e proteínas somáticas (ELLIS *et al.*, 1991) e por ser um patógeno intracelular facultativo a imunidade a *C. pseudotuberculosis* parece ser complexa e tem sido atribuída a dois mecanismos básicos: o mediado por células e o humoral (BATEY, 1986b; ZAKI, 1976).

Este microorganismo possui proteínas secretadas de pesos moleculares variados que induzem uma forte resposta imune humoral e celular em caprinos (PAULE *et al.*, 2003 e 2004b).

2.8.1. Imunidade Humoral

A resposta imune por anticorpos e a identificação de frações antigênicas responsáveis pela imunidade protetora foram investigadas por diversos autores. A resposta imune para a infecção natural por *C. pseudotuberculosis* tem mostrado incluir um forte componente humoral, com detecção de anticorpos circulantes para um grande número de antígenos (ELLIS *et al.*, 1991). Os pesos moleculares desses antígenos variam entre 22 e 120 KDa; 5 e 200 KDa e, em menor proporção, 68, 64, 43 e 22 KDa identificadas pela técnica de “Western Blotting”, utilizando-se antígenos somáticos e secretados (VALE *et al.*, 2003; PAULE *et al.*, 2003 e 2004b). No entanto, esta forte resposta humoral é incapaz de eliminar a infecção (VALE *et al.*, 2003).

A importância da defesa humoral tem sido estudada através da avaliação da eficácia de vacinas à base de toxóide ou toxina geneticamente modificada (por indução em laboratório ou por mutação espontânea), onde se observa que após o desafio, o número e tamanho de linfonodos comprometidos são reduzidos em animais vacinados, além da redução do número de animais que apresentam granulomas (MOURA-COSTA *et al.*, 2008; DORELLA *et al.*, 2008; D’FONSECA *et al.*, 2008; ZAKY, 1976). Testes realizados com a fração, tanto em caprinos (ANDERSON E NAIRN, 1984; BROWN *et al.*, 1986; ALVES E OLANDER, 1999) como em ovinos (PATON *et al.*, 1995), mostraram níveis de proteção próximos ou acima de 80%. Por outro lado, estudos comparando a eficácia de vacinas incorporando as frações secretadas, somáticas ou as duas, mostraram que a incorporação da fração somática não modificava o índice de proteção já induzido pela fração toxóide (BURRELL, 1978b).

A fosfolipase D, como dito anteriormente, é uma potente exotoxina de 31,4 KDa que permite que a bactéria se dissemine pelo organismo do hospedeiro ao aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos (CARNE e ONON, 1978). Segundo Yozwiak e Songer (1993), anticorpos anti-fosfolipase D presentes antes da infecção exercem efeito protetor dificultando a disseminação da bactéria para os linfonodos.

A resposta imune humoral é uma resposta intensa e presente em animais imunizados e naturalmente infectados (VALE, 2005). Esta resposta por anticorpos é regulada por citocinas produzidas em decorrência da interação do antígeno com as células imunocompetentes (MCINTYRE *et al.*, 1993).

2.8.2. Imunidade Celular

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram que os granulomas são formados internamente de um centro necrótico cercado até a periferia, por uma zona de macrófagos e uma zona de linfócitos, limitado externamente por uma cápsula fibrótica. A zona de linfócitos é rica em linfócitos $T\gamma\delta$ e B, ao lado da cápsula fibrótica (WALKER *et al.*, 1991; PÉPIN *et al.*, 1994).

A organização e composição celular dos granulomas provocados pela infecção por *C. pseudotuberculosis* são similares nas infecções por outras bactérias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (FLYNN *et al.*, 1993) ou *Listeria monocytogenes* (NAKANE *et al.*, 1989). Dentre os pontos em comuns, destacam-se a predominância dos linfócitos T CD8 (MODLIN *et al.*, 1983) que atuam diretamente como células citotóxicas, ou como ativadoras

de macrófagos via IFN- γ (KAUFMANN, 1988), ou ainda, indiretamente, podendo apresentar um fenótipo supressor (MODLIN *et al.*, 1983).

Em infecções causadas por *C. pseudotuberculosis* foi demonstrado, através da técnica de RT-PCR semiquantitativa, o aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β , associado a baixas concentrações de interleucina-4 em ovinos experimentalmente infectados (PÉPIN *et al.*, 1997). Nestes animais verificou-se alta expressão de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α no sítio de inoculação, enquanto que a expressão de citocinas associadas às células T, como IL-12 e IL-4, foi mais intensa no linfonodo drenante. Com base nos resultados deste estudo, os autores sugeriram que o desenvolvimento do granuloma poderia ser consequência de células Th1, Th2 e de citocinas como IFN- γ , IL-12, IL-4, TNF- α e MCP-1, cujos níveis estavam elevados durante a sua formação.

Os primeiros ensaios que destacaram a importância da resposta celular na proteção contra infecções por *C. pseudotuberculosis*, mostraram que no modelo murino, a resolução da infecção estava associada à presença de macrófagos ativados dentro da lesão (JOLLY, 1965b).

Estudos mais recentes confirmaram o envolvimento da resposta celular, mais especificamente, da indução de uma resposta Th1, que é comprovadamente importante na resistência contra bactérias intracelulares facultativas (KAUFMANN, 1993).

As células T CD4 e, principalmente seus clones Th1, são responsáveis pela produção de IFN- γ e TNF- α , citocinas que aumentam a atividade bactericida dos macrófagos. O papel protetor das células T CD8 está relacionado à sua capacidade de produzir IFN- γ e lisar células infectadas. Em murinos, a administração de anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 aumentaram a letalidade e levaram à redução de interferon gama, sugerindo que ambas as subpopulações de

linfócitos são essenciais no processo de resistência à *C. pseudotuberculosis* (LAN *et al.*, 1998).

Hogdson *et al.* (1992) registraram alta produção de IFN- γ por ovinos desafiados com linhagens virulentas de *C. pseudotuberculosis* e REGIS (2001) obteve resultados idênticos com caprinos naturalmente infectados.

O IFN- γ é uma citocina extremamente pleiotrópica que é muito importante na regulação da resposta imune e nos processos inflamatórios. A modulação da resposta imune pelo controle da expressão das moléculas de MHC classes I e II por diversos tipos de células, a ativação e regulação da diferenciação de fagócitos e a habilidade para regular a ativação e a diferenciação das células T CD4⁺ estabelecem o IFN- γ como um componente chave na determinação do tipo de função que é desenvolvida durante o curso da resposta imune (MEYER *et al.*, 2005).

Um estudo realizado por Mohan *et al.* (2001), no qual foram utilizados camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* como um modelo para a tuberculose latente, demonstrou evidências de que o TNF- α é essencial na prevenção da reincidência da tuberculose. Esta evidência é confirmada em seu experimento ao utilizar camundongos tratados com anticorpos monoclonais que neutralizavam o TNF- α . Estes camundongos tratados com o anti-TNF- α tiveram uma reativação fatal da doença, com severa deterioração histopatológica, redução na expressão da enzima óxido nítrico sintase nos pulmões, o que contribuiu com o aumento da carga bacteriana e reincidência da doença. Além disso, observou-se que houve um aumento na expressão de IL-10 nos pulmões, o que potencialmente favoreceu a progressão da doença devido à atenuação da atividade anti-micobacteriana dos

macrófagos e devido à modulação da resposta histopatológica do hospedeiro pela regulação da expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e receptores de quimiocinas.

A relação das linfocinas produzidas pelas células T CD4⁺ com o desenvolvimento do piogranuloma e a persistência da bactéria no hospedeiro foram sugeridas por Pépin *et al.* (1991) que observou uma grande produção de IFN- γ e baixa produção de IL-4.

A citocina IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida por células Th2 e mediadora de efeitos antiinflamatórios, atuando primariamente em células fagocíticas e em células apresentadoras de antígenos (FIORENTINO, BOND e MOSMANN, 1989).

Muitos estudos têm demonstrado que a principal fonte de IL-10 pode ser as células T que também produzem IFN- γ , células CD4⁺, CD25⁺, foxp3, além das células Th2 ou células infectadas ou expostas a componentes dos parasitas; podendo ainda os macrófagos ser os produtores predominantes de IL-10 durante os estágios iniciais da fase aguda da infecção (TRINCHIERI, 2001; POHL-KOPPE *et al.*, 1998).

A citocina IL-12 tem sido descrita como uma citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos e células B em resposta a infecções bacterianas. A IL-12 induz a secreção IFN- γ pelas células T e células NK. Além disso, esta citocina é capaz de induzir a secreção tanto de IFN- γ como IL-10 pela mesma célula T, tanto que a utilização de anticorpos monoclonais contra a IL-12 aboliu a geração desse sub-tipo de células (POHL-KOPPE *et al.*, 1998).

A citocina IL-10 inibe nas células fagocíticas e células apresentadoras de antígenos a transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IL-12, a expressão do MHC de classe II, moléculas co-estimulatórias, bem como a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (OSWALD *et al.*, 1992; MOORE *et al.*, 2001).

Além de inibir os mecanismos bactericidas intracelulares, a IL-10 previne a apoptose mediada pelo TNF sobre macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, possibilitando, então, a manutenção da infecção crônica (ROJAS *et al.*, 1999).

Muitos estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que a produção de IL-10 *in vivo* durante a infecção por patógenos intracelulares representa um mecanismo regulatório para prevenir respostas inflamatórias sistêmicas patogênicas. A utilização de camundongos geneticamente deficientes em IL-10 tem confirmado o caráter regulatório desta citocina (TRINCHIERI, 2001). Nestes animais, a habilidade em resistir à infecção por patógenos tais como *Leishmania major*, *M. tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, ou *Toxoplasma gondii* é aumentada ou inalterada (KANE e MOSSER, 2001). No entanto, freqüentemente se observa uma severa resposta patogênica inflamatória nestes animais. Camundongos deficientes em IL-10 exibem uma hiperinflamação intracerebral letal devido à meningoencefalite causada pela *L. monocytogenes*, enquanto, se infectados intraperitonealmente, eles exibem uma hiperinflamação hepática (DECKERT *et al.*, 2001).

A interleucina-4 (IL-4) é uma citocina pleiotrópica produzida primariamente por subclasses de linfócitos T, as células Th2, e por basófilos, eosinófilos e mastócitos. A IL-4 induz a diferenciação de precursores virgens de células T CD4⁺ em células Th2 e inibe a diferenciação de células Th1, mas também aumenta a diferenciação, proliferação e ativação de várias células inflamatórias (JAIN-VORA *et al.*, 1998).

Esta citocina exerce um papel importante na regulação da diferenciação de células T virgens após estímulo antigênico. A IL-4 induz tais células a se desenvolverem em células capazes de produzir IL-4 e uma série de outras citocinas, incluindo IL-5, IL-10 e IL-13 (células do perfil Th2), bem como suprime o aparecimento de células T CD4 produtoras de

IFN- γ (NELMS *et al.*, 1999). Além disso, a IL-4 induz a proliferação de células B ativadas, células T, tímócitos e clones de células NK (PENE *et al.*, 1988).

Uma outra função de grande importância fisiológica é o controle exercido pela IL-4 na especificidade do “switch” da classe da imunoglobulina (NELMS *et al.*, 1999).

3. JUSTIFICATIVA

A caprino-ovinocultura é de grande importância para a fixação do homem ao campo, em especial na região nordeste. Além de trazer o sustento para famílias de trabalhadores rurais no nordeste, a criação de caprinos e ovinos se constitui como uma rica fonte nutricional para seus moradores. A linfadenite caseosa é uma doença que traz sérios prejuízos econômicos para estes trabalhadores e para a economia da região devido principalmente à condenação de carcaças e depreciação das peles destes pequenos ruminantes.

Com intuito contribuir para o entendimento da relação parasita-hospedeiro, este estudo procurou avaliar o tipo de resposta que o hospedeiro apresenta frente aos antígenos secretados por *C. pseudotuberculosis*, na infecção com a linhagem selvagem, que é encontrada naturalmente no ambiente de criação dos animais, quanto da linhagem atenuada, que tem se demonstrado bastante promissora à produção de vacinas.

O modelo murino foi escolhido devido às inúmeras vantagens na sua utilização tais como o fácil manejo, a existência de linhagens isogênicas, a fácil obtenção de reagentes específicos para experimentos com esta espécie, além de demonstrar um padrão de resposta à doença que guarda semelhanças ao observado com os caprinos e ovinos, sendo assim um modelo para estudo da infecção por *C. pseudotuberculosis*.

O aprofundamento do conhecimento dos mecanismos imunológicos, do papel de biomoléculas antigênicas ou não, e de variações de virulência do agente, é muito importante para o avanço de técnicas para o diagnóstico e para o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de induzir uma imunidade protetora contra esta importante enfermidade.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação do antígeno secretado total de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e de sua fração purificada Q5 sobre a resposta “in vivo” por anticorpos e “in vitro” por células esplênicas de camundongos Balb/c infectados experimentalmente com uma linhagem selvagem e outra atenuada de *C. pseudotuberculosis*.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar a produção de citocinas *in vitro* por células esplênicas de camundongos Balb/c infectados experimentalmente com uma linhagem selvagem e com linhagem uma atenuada de *C. pseudotuberculosis*, estimuladas pelo antígeno secretado total e sua fração Q5.
- ✓ Avaliar a resposta imune humoral, através da dosagem de anticorpos IgG contra componentes do antígeno total e de sua fração Q5, bem como as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, em camundongos Balb/c infectados experimentalmente com uma linhagem selvagem e com outra atenuada de *C. pseudotuberculosis*.
- ✓ Demonstrar, através da eletroforese em gel de poliacrilamida e do *western blotting*, o perfil de peso molecular dos antígenos secretados, mencionados acima.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS E INFECÇÃO

Foram utilizados 25 camundongos isogênicos da linhagem Balb/c, fêmeas, com sete semanas de vida, fornecidas pelo Biotério da Universidade de Campinas (UNICAMP-SP). Foram utilizadas duas linhagens de *C. pseudotuberculosis* para a infecção, sendo uma a linhagem selvagem VD57 e a outra a linhagem atenuada T1, ambas isoladas de granuloma de caprinos do interior do estado da Bahia, e mantidas na coleção do laboratório de Microbiologia do ICS/UFBA. As linhagens foram identificadas pelo kit API coryne (BioMérieux AS, Marcy-l'Etoile, França).

Dez animais foram infectados com 10^2 unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem atenuada T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e outros 10 animais foram infectados com 10^2 UFC da linhagem selvagem VD57 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ambos por via intraperitoneal. Os animais sadios do grupo controle foram sacrificados no tempo zero. Com 15 dias, 5 camundongos do grupo de animais infectados com a linhagem selvagem VD57 e 5 camundongos do grupo de animais infectados com a linhagem atenuada T1 foram sacrificados em câmara de CO₂ para os ensaios de produção *in vitro* de citocinas. O mesmo procedimento foi repetido com 35 dias de infecção.

Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada e água e permaneceram sob condições controladas de temperatura, luminosidade e umidade.

5.2. COMITÊ DE ÉTICA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para o Desenvolvimento das Ciências, sob protocolo nº 013/2007.

5.3. PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS

5.3.1. Obtenção do Antígeno Secretado (SeT1)

A linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis* foi semeada em meio BHI a 37°C, 72 h. As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C durante 30 min. e o sobrenadante coletado foi posteriormente filtrado. O sobrenadante da cultura foi saturado com 30% de sulfato de amônia a temperatura ambiente, sob leve agitação, até solubilizar completamente. Em seguida o pH foi ajustado com HCl para o pH 4.0, sendo, então, adicionado o n-butanol PA (1:2). Após forte agitação em vórtex por 1min e repouso por 1h, o precipitado protéico foi coletado e centrifugado a 1350g durante 10 min. (PAULE *et al.*, 2004a). A interface precipitada foi coletada e dissolvida em volumes pequenos de tampão PBS 10mM (500µl de extrato para 5 mL de tampão) e em seguida, dializada em tampão fosfato (0,5M; pH 7,4) por 48h em câmara fria, trocando o tampão a cada 12h.

5.3.2. Cromatografia para obtenção da fração Q5

O fracionamento do antígeno secretado de *C. pseudotuberculosis* foi feito por cromatografia de troca iônica de alta performance. Este procedimento foi realizado em coluna de troca aniônica (Mono Q HR 5/5), onde dentre outras frações obteve-se a fração Q5.

O procedimento foi iniciado com a diálise da amostra a ser aplicada na coluna, *overnight* a 5°C em tampão fosfato 5mM, pH 7,4. Após a diálise, a coluna Mono Q HR 5/5 foi eluída com tampão fosfato 50mM, pH 7,4 e uma vez que a coluna estava equilibrada, foi feita a aplicação da amostra, obtendo-se o primeiro pico composto por proteínas que não se ligaram na coluna (Q1). Um gradiente de eluição feito com injeção de NaCl 1M na proporção de 10% para 90% do tampão fosfato 50mM, com a subsequente obtenção da fração Q2. A proporção da solução com NaCl foi aumentada até 60%, que corresponde ao último pico (fração Q7). A fração Q5 foi obtida com 40% do tampão contendo NaCl 1M, e em seguida, dializada com tampão PBS 10mM e liofilizada.

5.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E WESTERN BLOTTING

Os antígenos foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. O sistema utilizado foi o descontínuo, composto de um gel de empilhamento constituído por 4% de acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 10% SDS, 0,05% de persulfato de amônia, 0,05% de “Temed” e contendo Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. Esse gel foi colocado sobre um gel de corrida constituído por 12% de acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 10% SDS, 0,05% persulfato de Amônia, 0,05% de “Temed”, contendo ainda Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

A eletroforese foi realizada em tampão de migração contendo Tris 0,124 M, glicina 0,96 M, 0,5% de SDS, pH 8.3 durante, 1 hora, numa corrente de 30mA.

As proteínas separadas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (MILLIPORE), em tampão de transferência contendo Tris 0,25 M, Glicina 0,193 M e 20% de Metanol.

Após a transferência, a membrana foi corada com uma solução aquosa de vermelho Ponceau S, descorada em água destilada e cortada em tiras de aproximadamente 3mm.

As tiras foram bloqueadas com BSA (Soro albumina bovina) a 5% em salina fosfato contendo 0,1% de tween 20 (PBS-T 20), por 12 horas a 4° C. Um “pool” de soro de camundongos positivos e negativos foram diluídos na proporção 1:50 para as tiras contendo a fração Q5, em PBS-T 20 contendo 1 % de leite desnatado, durante 1 hora e 30 min. a 37° C. A seguir foram incubadas durante 1 hora a 37° C, com anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído na proporção de 1:100 em PBS-T 20 . A revelação das bandas foi feita com 4-cloro- α -naftol e peróxido de hidrogênio em PBS.

5.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração protéica dos antígenos foi determinada pelo kit de dosagem de proteínas da marca Bio-Rad (método modificado de LOWRY).

5.6. ENSAIO COM CÉLULAS ESPLÊNICAS

5.6.1. Obtenção das Células Esplênicas

Os baços dos camundongos foram retirados assepticamente e lavados duas vezes em meio RPMI 1640 (Sigma). As células do baço foram coletadas por divulsão em meio RPMI suplementado com SFB a 10% e contadas em câmara de Neubauer, assegurando-se a viabilidade através da exclusão com o corante Azul de Tripán.

5.6.2. Ensaio com Células Esplênicas

As células esplênicas, numa concentração de 10^6 /mL foram cultivados em placas de 24 poços. A concentração dos mitógenos pokweed (PWM) e LPS foi $5\mu\text{g/mL}$. A concentração dos antígenos SeT1 e fração Q5 foi $40\mu\text{g/mL}$. As células esplênicas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 72h. Após este período de incubação o conteúdo foi coletado, centrifugado e o sobrenadante armazenado a -20°C .

5.7. ELISA SANDUÍCHE PARA TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-4

Os níveis de citocinas nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas estimuladas com os mitógenos e com os antígenos foram determinados usando “Kits” comerciais para IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 (R&D, USA) de acordo com as instruções do fabricante, resumidas a seguir: Placas de ELISA (Costar) foram sensibilizadas com $100\mu\text{L}$ por poço do

anticorpo de captura da citocina (gerada em camundongo) diluído em PBS filtrado e incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Após este período as placas foram lavadas dez vezes com tampão PBS-T (este procedimento de lavagem foi realizado em todas as etapas). O bloqueio foi realizado com PBS-SFB 2%, por duas horas à temperatura ambiente. Após a lavagem, adicionou-se 100µL por poço das amostras e dos padrões, os quais foram incubados por duas horas à temperatura ambiente. O anticorpo de detecção diluído no reagente diluente (PBS-SFB 1%) foi adicionado (100µL por poço), incubado por duas horas à temperatura ambiente, sendo, então, realizada a lavagem. O conjugado Avidina-HRP foi diluído em reagente diluente na proporção 1:200 e adicionado 100µL por poço e incubado por 20 min. à temperatura ambiente. Foi feita a lavagem e, então, adicionado o substrato TMB (100µL por poço), o qual foi incubado por 20 min. à temperatura ambiente no escuro. A reação foi parada com 50µL da solução H₂SO₄ a 2N em cada poço. Em seguida, foi feita a leitura fotocolorimétrica com filtro de 450 a 620nm. As concentrações de citocinas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão, gerada de citocinas recombinantes e os resultados foram expressos em picogramas por mililitro.

5.8. ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE IgG TOTAL E SUAS SUBCLASSES

As placas (Costar) foram sensibilizadas com 1µg/100µL por poço de antígeno SeT1 de *C. pseudotuberculosis* e 0,5µg/100µL por poço da fração Q5 em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e a seguir foram incubadas *overnight* à 4°C. Após este período as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-T 0,05% (tampão de lavagem utilizado em todas as etapas), bloqueadas com 200µL de leite desnatado a 5% por duas horas a 37 °C. As placas foram

lavadas 1 vez e a seguir adicionou-se 50 μ L de soro diluído 1:100 em PBS-T contendo leite desnatado a 1%. As placas foram incubadas por 1h a 37°C e lavadas 5 vezes. Acrescentou-se 50 μ L de conjugado (IgG de cabra com peroxidase contra IgG total de camundongo ou suas subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) diluído 1:10.000 em PBS-T incubando-se por 1h à 37°. Após 5 lavagens adicionou-se 50 μ L da solução reveladora TMB, deixando por 15 min. A temperatura ambiente, no escuro. A reação foi interrompida com 25 μ L de H₂SO₄ 4N e a leitura foi feita em fotocolorímetro automático para leitura de ELISA com filtro 450 a 620nm.

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez verificado que as variáveis estudadas não tinham distribuição normal, optou-se pela utilização de testes estatísticos de distribuição livre ou testes não paramétricos por não dependerem do conhecimento da distribuição da variável na população. As tendências centrais dos grupos independentes, dois a dois, foram comparadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Todas as análises dos dados obtidos foram feitas com o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 12.0 para Windows.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO ANTÍGENO SeT1 E DA SUA FRAÇÃO Q5 EM SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING.

O antígeno SeT1, como pode ser observado na figura 1, apresenta 23 bandas protéicas que variam de 196,14 KDa até aproximadamente 6 KDa.

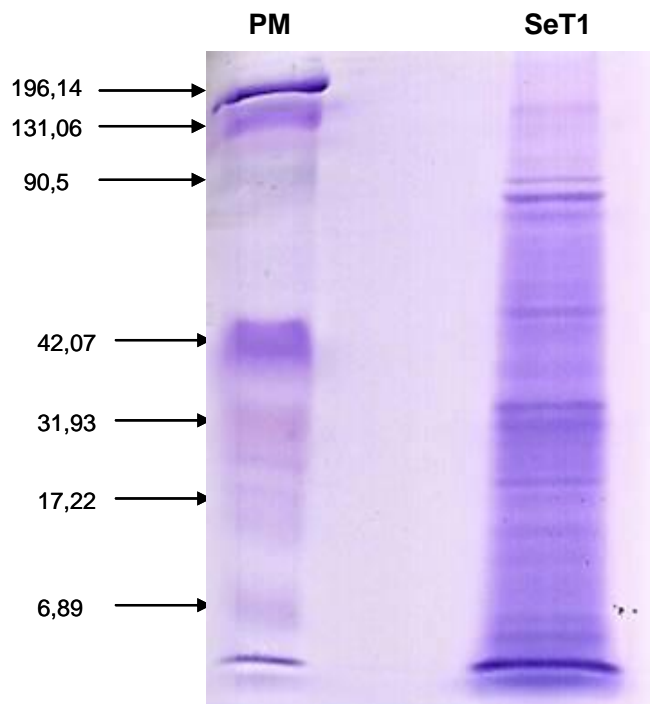


Fig. 1 – Eletroforese do antígeno SeT1 em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%, corado com azul de Coomassie. Os números se referem aos pesos moleculares em KDa. PM: Peso molecular. SeT1: antígeno secretado.

Conforme visualizado na figura 2, Q5 apresenta cinco bandas protéicas que variam de aproximadamente 20 até 75 KDa. A figura 2a mostra o resultado do western blotting com esta fração, onde se pode notar a presença de quatro bandas com PM de 30, 53, 54 e 75 KDa

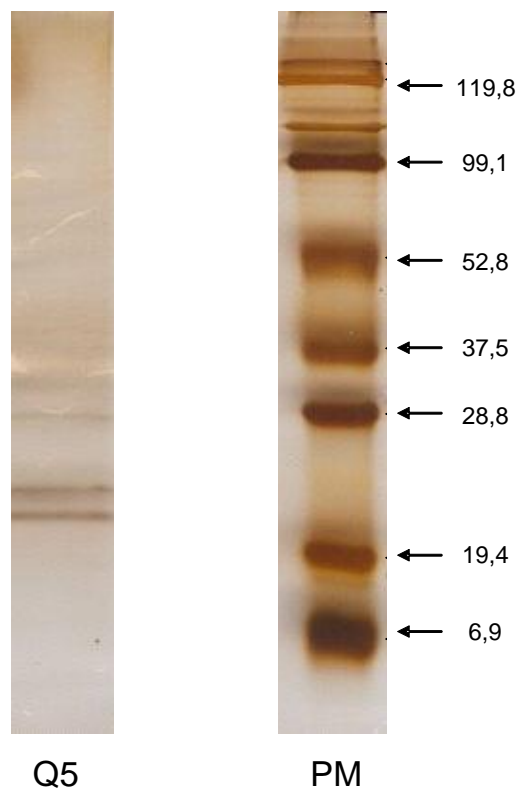


Fig. 2 – Eletroforese da fração Q5 em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%, corado com Nitrato de Prata. Os números se referem aos pesos moleculares em KDa. PM: Peso Molecular, Q5: Fração Q5

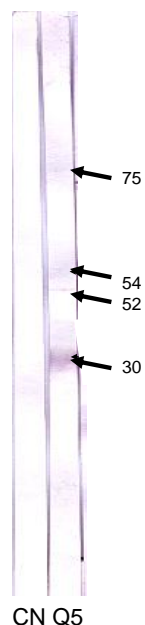


Fig. 2a. *Western Blotting* realizado a partir da transferência eletroforética da fração antigênica Q5. Q5: Fração Q5, CN: controle negativo. Os números se referem aos pesos moleculares em KDa

6.2. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE CITOCINAS POR CÉLULAS ESPLÊNICAS FRENTE A ESTÍMULOS ANTIGÊNICOS, AO LONGO DA INFECÇÃO.

Foram dosadas as citocinas TNF- α , IL-10, IFN- γ e IL-4, em sobrenadantes de culturas de células esplênicas de camundongos, no tempo zero (grupo controle) e aos 15 e 35 dias de infecção com a linhagem selvagem (VD57) e atenuada (T1) de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

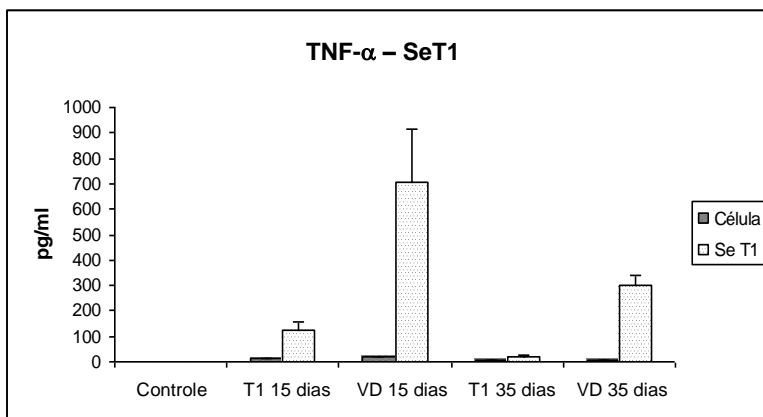


Fig. 3 – Produção *in vitro* de TNF- α por células esplênicas de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1 sob estímulo do antígeno Se T1.

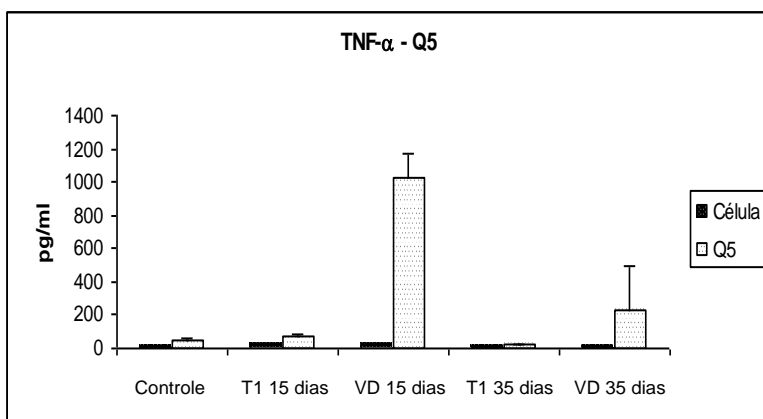


Fig. 4 - Produção *in vitro* de TNF- α por células esplênicas de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1 sob estímulo da fração Q5.

As figuras 3 e 4 apresentam a produção *in vitro* do TNF- α pelas células esplênicas dos camundongos infectados com a linhagem selvagem (VD57) e atenuada (T1) quando estimuladas pelo antígeno SeT1 (figura 3) e sua fração Q5 (figura 4).

Células esplênicas dos animais infectados com a linhagem selvagem (VD57), sob a ação dos dois antígenos, apresentaram maior produção *in vitro* de TNF- α aos 15 dias de infecção com diferença estatisticamente significativa quando comparados com o tempo zero e 35 dias ($p < 0,01$). Aos 35 dias esta produção decresceu, não havendo diferença em relação ao tempo zero. Quando os tempos 15 e 35 dias são confrontados, observa-se que houve uma produção expressiva de TNF- α aos 15 dias de infecção com diferença estatisticamente significativa quando comparado com 35 dias ($p < 0,01$). Quando se compara os respectivos tempos de infecção entre os estímulos (SeT1 e Q5), se observa que Q5 induz uma maior produção desta citocina com diferença estatisticamente significativa aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$).

Na infecção com a linhagem atenuada T1 aos 15 dias há maior produção dessa citocina quando comparado ao tempo zero e 35 dias, entretanto, não existe diferença estatisticamente significativa. Mas, a análise entre os tempos de 15 e 35 dias indica uma diminuição significativa aos 35 dias ($p < 0,01$). Nos animais infectados com a linhagem T1 observa-se que Q5 estimula maior produção de TNF- α com diferença estatisticamente significativa nos 15 dias de infecção quando comparados com o antígeno SeT1 ($p < 0,05$).

Em ambos os tempos (15 e 35 dias) constata-se maior produção de TNF- α na infecção com a linhagem selvagem quando comparados a linhagem atenuada. Aos 15 dias de infecção houve diferença significativa entre as linhagens ($p < 0,01$), sob estimulação dos dois antígenos, enquanto aos 35 dias de infecção esta diferença foi observada somente sob o estímulo da fração Q5.

As figuras 5 e 6 apresentam a produção *in vitro* do INF- γ pelas células esplênicas dos camundongos infectados com a linhagem selvagem (VD57) e atenuada (T1) quando estimuladas pelo antígeno SeT1 (figura 5) e sua fração Q5 (figura 6).

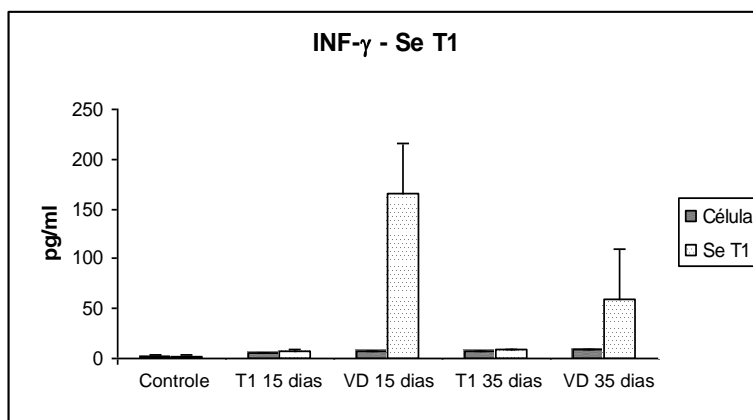


Fig. 5 – Produção *in vitro* de INF- γ por células esplênicas de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1 sob estímulo do antígeno Se T1.

Verifica-se uma maior produção INF- γ pelas células estimuladas com o antígeno SeT1 no 15º dia de infecção com a linhagem selvagem VD57, entretanto, a diferença só é estatisticamente significativa quando comparado ao tempo zero ($p < 0,01$). Esta produção diminui no 35º dia, porém ainda com níveis expressivos em relação ao controle ($p < 0,01$), como demonstrado na figura 5.

Quando a produção desta citocina é analisada ao longo do tempo, não se observa diferença estatisticamente significante entre 15 e 35 dias de infecção.

As culturas estimuladas com o antígeno SeT1 apresentaram níveis discretamente maiores de INF- γ quando comparadas às culturas estimuladas com a fração Q5 aos 15 e 35 dias de infecção com a linhagem selvagem, no entanto, sem significado estatístico.

A ação deste estímulo, nos diferentes tempos, não implicou em diferenças estatisticamente significativas sobre a produção de INF- γ pelas células esplênicas dos camundongos infectados com a linhagem atenuada T1 (Figura 5).

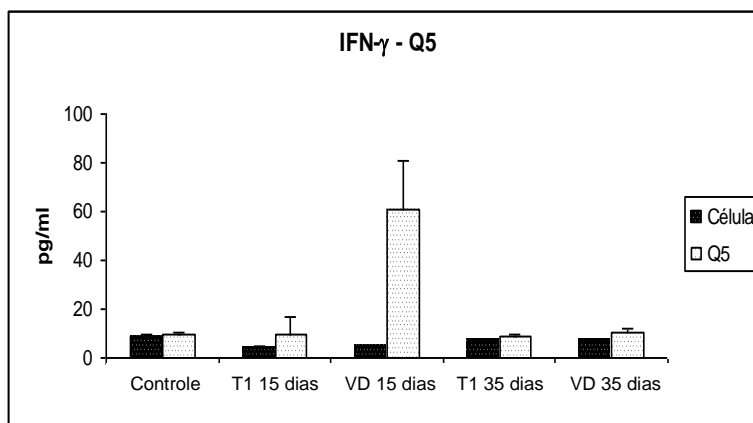


Fig. 6- Produção *in vitro* de INF- γ por células esplênicas de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1 sob estímulo da fração Q5.

Quando as células de camundongos da linhagem VD57 foram estimuladas com a fração Q5 (Figura 6), também se observou uma maior produção de INF- γ no 15º dia de infecção em relação ao tempo zero e 35 dias ($p < 0,01$). Porém, não existe diferença entre zero e 35 dias. Ao se comparar os tempos de 15 e 35 dias, verifica-se diferença significativa no grupo infectado com a linhagem selvagem ($p < 0,01$).

Na infecção com a linhagem atenuada T1, os valores de produção desta citocina observados nos dias 15 e 35 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle e entre si.

Nas figuras 5 e 6, ao se comparar os resultados obtidos com as linhagens atenuada e selvagem nos tempos de 15 e 35 dias, verificou-se maior produção de INF- γ na infecção com a linhagem selvagem em relação à produção verificada nas culturas dos animais infectados com a linhagem atenuada aos 15 dias de infecção para ambos os estímulos ($p < 0,01$). No entanto, no 35º dia esta diferença significativa foi observada somente sob estímulo de SeT1.

As figuras 7 e 8 apresentam a produção *in vitro* de IL-10 pelas células esplênicas dos camundongos infectados com a linhagem selvagem (VD57) e atenuada (T1) quando estimuladas pelo antígeno SeT1 (figura 7) e sua fração Q5 (figura 8).

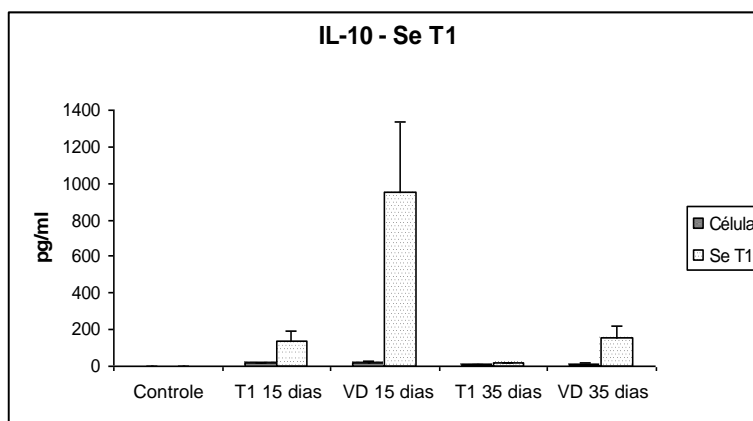


Fig. 7 – Produção *in vitro* de IL-10 por células esplênicas de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1 sob estímulo do antígeno Se T1.

Na figura 7 verificou-se uma elevada produção de IL-10 aos 15 dias de infecção com a linhagem selvagem sob estímulo de SeT1 em relação ao tempo zero e 35 dias ($p < 0,01$). Apesar de haver uma queda significativa com 35 dias de infecção, verifica-se neste tempo níveis de produção estatisticamente superiores ao tempo zero ($p < 0,01$).

Na infecção com a linhagem atenuada (T1) observa-se uma produção bem menor de IL-10 em relação à linhagem selvagem aos 15 dias de infecção, mas com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tempo zero e 35 dias ($p < 0,01$).

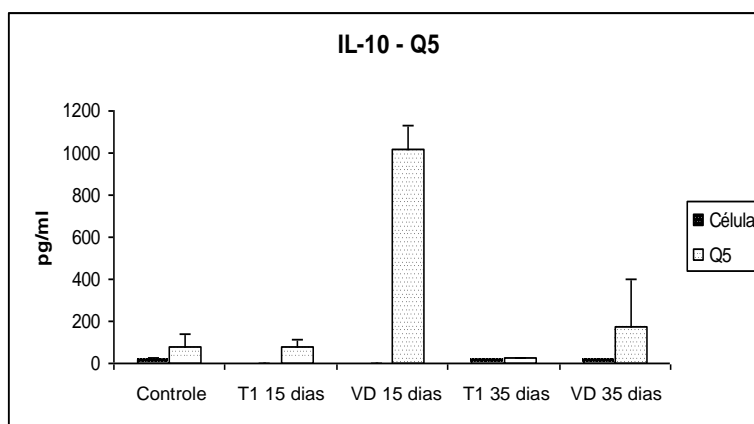


Fig. 8 - Produção *in vitro* de IL-10 por células esplênicas de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1 sob estímulo da fração Q5.

Na figura 8 verificou-se uma elevada produção de IL-10 aos 15 dias de infecção com a linhagem selvagem quando comparado ao tempo zero e aos 35 dias de infecção ($p < 0,01$). Entretanto, não existe diferença estatisticamente significativa quando se compara 35 dias de infecção e tempo zero.

Animais infectados com a linhagem T1 sob estímulo da fração Q5 tiveram uma produção basal de IL-10 em todos os tempos. Os grupos infectados com T1, correspondentes aos 15 e 35 dias não tiveram uma produção expressiva de IL-10 quando comparados ao grupo controle.

Sob os estímulos dos dois antígenos estudados, SeT1 e a fração Q5, (Figuras 7 e 8) verificou-se que para cada tempo pareado houve diferença estatisticamente significativa entre as infecções com a linhagem atenuada (T1) e a selvagem (VD57), sendo que os esplenócitos de camundongos infectados com VD57 apresentaram maior produção de IL-10 ($p < 0,01$). A produção desta citocina sob os estímulos de SeT1 e Q5 foi muito semelhante em todos os tempos e infecções.

As figuras 9 e 10 apresentam a produção *in vitro* de IL-4 pelas células esplênicas dos camundongos infectados com a linhagem selvagem (VD57) e atenuada (T1) quando estimuladas pelo antígeno SeT1 (figura 9) e sua fração Q5 (figura 10).

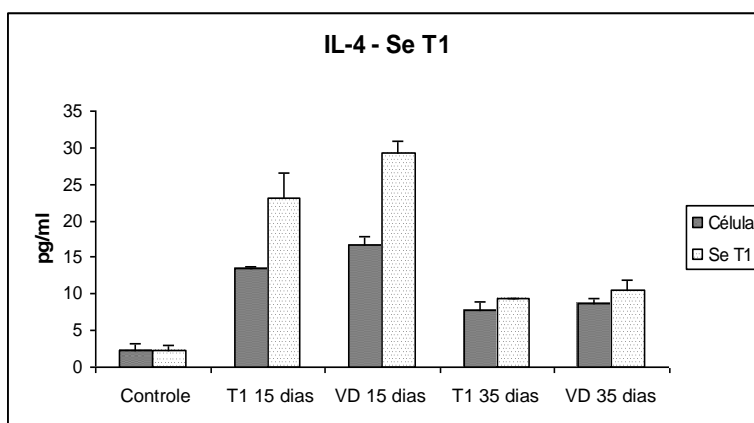


Fig. 9 – Produção *in vitro* de IL-4 por células esplênicas de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1 sob estímulo do antígeno Se T1.

Na figura 9 observou-se uma produção de IL-4 aumentada aos 15 dias de infecção com a linhagem selvagem (VD57). Comparando este tempo aos tempos zero e 35 dias de infecção se nota diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) quando utilizado o antígeno secretado como estímulo. Aos 35 dias os níveis de produção se mantiveram superiores ao tempo zero ($p < 0,01$).

Na infecção com a linhagem atenuada também houve uma maior produção aos 15 dias de infecção em relação ao controle ($p < 0,01$) e a 35 dias de infecção ($p < 0,05$). Quando comparamos os níveis de produção entre 35 dias de infecção e o controle observa-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Somente com 15 dias de infecção foi possível detectar diferenças entre as linhagens, onde o grupo VD57 15 dias apresentou níveis de IL-4 maiores que o grupo T1 15 dias ($p < 0,05$).

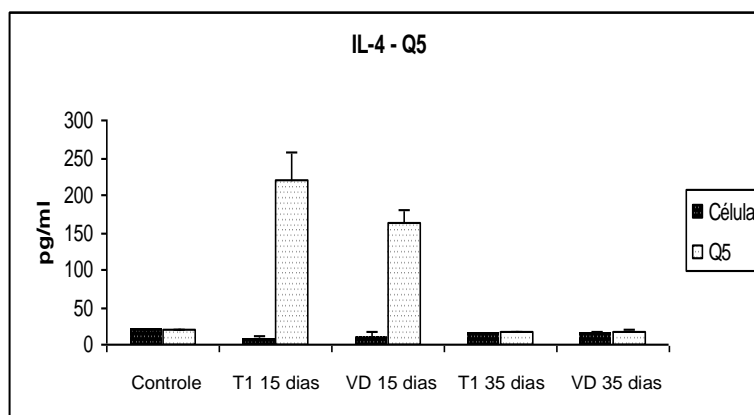


Fig. 10 - Produção *in vitro* de IL-4 por células esplênicas de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1 sob estímulo da fração Q5.

Quando a fração Q5 foi utilizada como estímulo na cultura (figura 10), verificou-se uma maior produção de IL-4 somente aos 15 dias de infecção com as duas linhagens em relação ao controle ($p < 0,01$). Estes níveis de IL-4 decresceram acentuadamente aos 35 dias ($p < 0,01$).

Ao contrário do observado nos demais gráficos, o grupo infectado com a linhagem atenuada (T1) aos 15 dias demonstrou maior produção da citocina quando comparada com a linhagem selvagem, no mesmo tempo ($p < 0,05$).

Aos 35 dias de infecção os níveis de expressão de IL-4 foram basais, não havendo também diferença estatística entre as linhagens bacterianas.

A produção de IL-4 foi significativamente maior sob o estímulo de Q5 do que com SeT1 em todos os tempos estudados e com as duas linhagens ($p < 0,01$).

O mitógeno pokweed (PWM) foi utilizado como controle positivo das reações para cada tempo e para cada citocina dos grupos infectados com a linhagem VD57 e T1. Observou-se que o PWM estimulou inespecificamente a produção das citocinas dosadas confirmando seu papel como controle positivo da reação (dados não mostrados).

6.3. PRODUÇÃO DE IgG TOTAL E SUAS SUBCLASSES PELOS CAMUNDONGOS BALB/C AO LONGO DA INFECÇÃO.

A figura 11 demonstra a produção de IgG total e as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 por camundongos balb/c infectados com as linhagens VD57 e T1, nos tempos zero (correspondente a soros de camundongos Balb/c sadios), 15 e 35 dias através da técnica de ELISA indireto, com a placa de poliestireno sendo sensibilizada com o antígeno Q5.

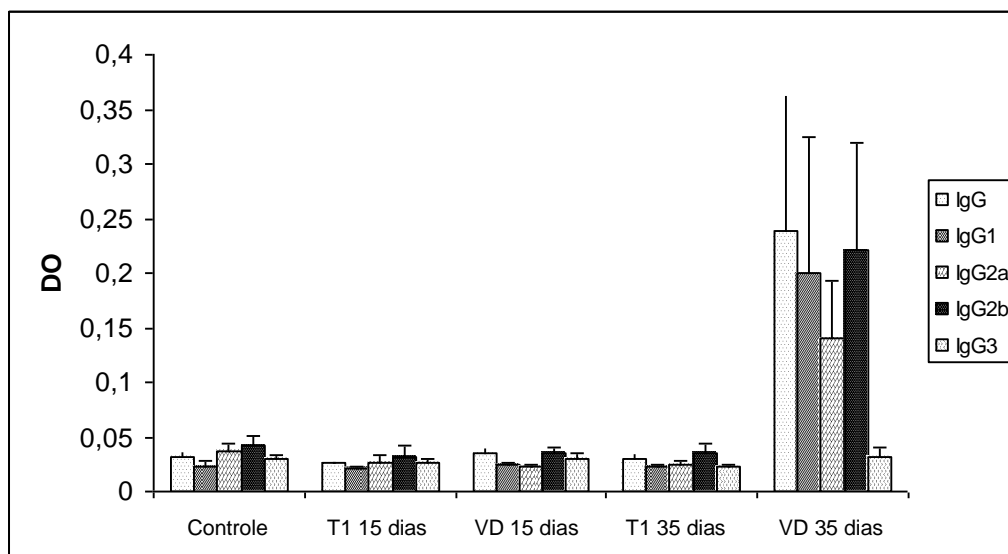


Fig. 11 – Avaliação da IgG total e suas subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1, aos 15 e 35 dias. Controle: tempo zero. ELISA Indireto sensibilizado com a fração Q5.

Ao analisar a produção de IgG e suas subclasses em cada infecção e ao longo do tempo, observou-se que não existe diferença estatisticamente significativa na infecção com a linhagem T1 nos dias 0 e 15 e 35, entretanto, na infecção com a linhagem selvagem, aos 35 dias os valores de IgG e IgG1, IgG2a e IgG2b apresentam diferenças estatisticamente significativas quando comparados aqueles observados com 0 e 15 dias. Quando avaliou-se as duas linhagens, somente aos 35 dias notou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), embora a IgG3 tenha apresentado níveis basais em todos os tempos e nos dois tipos de infecções (Figura 11).

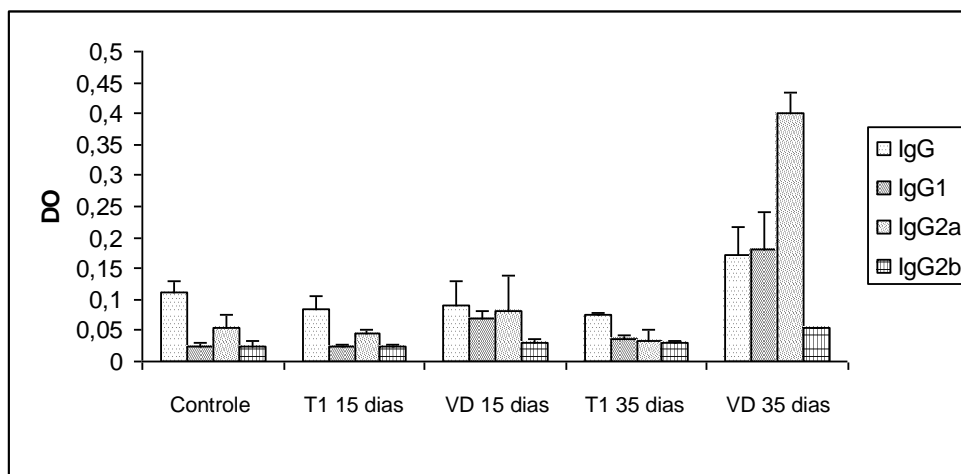


Fig. 12 – Avaliação da IgG total e suas subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b em soro de camundongos infectados com as linhagens VD57 e T1, nos 15 e 35 dias. Controle: tempo zero. ELISA Indireto sensibilizado com o antígeno SeT1.

A figura 12 mostra a produção de IgG e suas subclasses em cada infecção ao longo do tempo, utilizando o antígeno SeT1 para a sensibilização da placa de poliestireno. A infecção com a linhagem selvagem promoveu um aumento na produção de IgG e de todas suas subclasses com 35 dias, em relação a 15 dias e ao tempo zero ($p < 0,01$).

Ao comparar as linhagens T1 e VD57 aos 15 dias de infecção, houve diferença estatisticamente significativa na produção de IgG1 e IgG2b ($p < 0,01$). A mesma análise no tempo de 35 dias demonstrou diferença estatística para IgG, IgG1, IgG2a ($p < 0,01$) e IgG2b ($p < 0,05$).

A subclasse IgG2a aos 35 dias de infecção com a linhagem selvagem apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparada a IgG e demais subclasses ($p < 0,05$). A subclasse IgG3 apresentou produção basal em todos os tempos e nos dois tipos de infecção.

7. DISCUSSÃO

7.1. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE *IN VITRO* DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Os estudos de citocinas mostram uma grande importância da citocina pró-inflamatória TNF- α , sobretudo no local da infecção (PÉPIN *et al.*, 1997; ELLIS *et al.*, 1991) com decisiva função na fase primária e secundária da infecção (LAN *et al.*, 1998 e 1999). Paule *et al.* (2003), mostraram a produção de IFN- γ em caprinos utilizando antígenos secretados, e Pépin *et al.* (1997) evidenciaram a relação entre a formação do granuloma e expressão de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e MCP-1. Logan *et al.* (2005) demonstraram em bovinos infectados com *M. bovis*, que altas concentrações de IFN- γ indicam momentos ou períodos de proliferação do microorganismo.

Nas condições de tempo e concentração utilizadas nas infecções experimentais aqui relatadas, a linhagem atenuada T1 sob o efeito dos dois estímulos protéicos não foi capaz de estimular a produção das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10, apresentando níveis de estimulação semelhantes ao grupo controle, exceto para a citocina IL-4 que foi estimulada principalmente pela fração Q5. As células dos camundongos infectados com a linhagem selvagem VD57, sob a ação dos dois estímulos antigênicos, apresentaram um pico com 15 dias de infecção para as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-4, decrescendo aos 35 dias. Nos animais deste grupo, os antígenos secretados, total e fracionado, apresentaram resultados muito semelhantes quanto ao padrão e quantidade de citocinas produzidas “*in vitro*”, havendo diferenças estatisticamente significantes somente nos níveis de TNF- α e IL-4 produzidos, sendo que a fração Q5 induziu maior produção de ambas as citocinas. Este grupo experimental desenvolveu a doença, com

formação de granulomas, perda de peso e alto índice de mortalidade. Esta forte resposta inflamatória inicial observada nesses camundongos foi evidenciada pela elevada produção de TNF- α , sob a ação dos dois estímulos.

O antígeno total revelou uma discreta polarização para o perfil Th1, com uma produção de IFN- γ superior a de IL-4, confirmando os achados de Vale (2005) cujos preparados antigênicos, somático e secretado, estimularam *in vitro* a produção de IFN- γ e IL-12 em altas concentrações, que são citocinas do perfil Th1, enquanto que IL-4, citocina típica do padrão Th2, foi produzida em baixas concentrações em resposta a tais estímulos antigênicos. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, que demonstram ser o perfil de resposta predominantemente Th1, aquele responsável pela eliminação de bactérias intracelulares (LIM *et al.*, 2004; TRAJKOVIE *et al.*, 2004; FORTUNE *et al.*, 2004). Entretanto a fração Q5 apresentou estimulação com níveis mais elevados de IL-4, citocina típica do padrão Th2, com menor expressão de IFN- γ . Este achado não diverge dos demais, pois, segundo Vale (2005), a produção *in vitro* de IFN- γ começa a ter significado estatístico a partir dos 60 dias de imunização. O que também foi confirmado por Pépin *et al.* (1997) trabalhando com ovelhas.

Uma importante constatação foi a elevada produção de IL-10 induzida tanto pelo antígeno secretado como pela fração Q5, o que está de acordo com os resultados obtidos por Vale (2005). A produção expressiva desta citocina pode ser explicada através do papel regulatório da IL-10 sobre a síntese do IFN- γ , evitando desta forma a produção excessiva deste último em resposta ao processo infeccioso (PESTAKA *et al.*, 2004). Além disso, estudos têm mostrado que para o controle de outras infecções persistentes e por microorganismos de parasitismo intracelular, similares à causada por *C. pseudotuberculosis*, células T regulatórias

produzem tanto IFN- γ quanto IL-10 estimuladas pela IL-12 (TRINCHIERI, 2001; POHL-KOPPE *et al.*, 1998; ANDRADE, 2002).

7.2. A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS AO LONGO DA IMUNIZAÇÃO

A resposta por anticorpos é regulada pelas citocinas produzidas em decorrência da interação do antígeno com as células imunocompetentes (MCINTYRE *et al.*, 1993; SNAPPER *et al.*, 1997).

Neste trabalho foi observado que a resposta humoral se apresentou pouco intensa nos 35 dias de infecção, particularmente no grupo de animais infectados com a linhagem atenuada. Esta baixa resposta imune a uma linhagem atenuada já foi constatada por outros autores como Meyer (2003), em um trabalho realizado com a linhagem atenuada 1002 (linhagem Curaça) viva, com doses que variaram da ordem de 10^{10} a 10^{11} UFC/mL, com reforço após três meses, se observou no teste de ELISA valores máximos de DO abaixo de 0,400, para um ponto de corte de 0,250 e para valores de controle positivos entre 1,000 e 1,200. Hodgson *et al.* (1992) usando uma linhagem geneticamente modificada não produtora de fosfolipase D, observaram que a resposta humoral de ovinos imunizados com esta linhagem (10^7 UFC/mL) foi menos intensa que os animais infectados com a linhagem virulenta (10^6 UFC/mL), sugerindo que esta menor capacidade de induzir este segmento da resposta imune pode ser explicada pelo fato de linhagens atenuadas não produzirem ou produzirem menos exotoxina. Ademais, Vale *et al.* (2003), mostraram que o reconhecimento de proteínas por animais imunizados vai aumentando de acordo com o tempo de imunização e que as frações protéicas de baixo peso

molecular são reconhecidas mais tardiamente, entretanto, a exotoxina conhecida por fosfolipase D é reconhecida no primeiro mês de imunização.

É importante destacar que embora a produção de anticorpos seja importante para evitar a disseminação da bactéria, a presença, sobretudo no microambiente do granuloma, de citocinas como IFN- γ pode limitar a doença e reduzir a disseminação deste microrganismo (PÉPIN *et al.*, 1997). Por outro lado, de acordo com este autor, a fosfolipase D não participa dos eventos iniciais que levam à formação do granuloma, mas parece ser importante dentro dele, para a persistência crônica destas lesões.

Do conjunto de proteínas secretadas por este microrganismo, apenas esta é bem caracterizada e com um papel bem definido na patogenia da doença (McNAMARA *et al.*, 1994; SONGER *et al.*, 1997), porém induz baixo nível de proteção quando animais imunizados apenas com ela são submetidos a desafio (HODGSON *et al.*, 1999). O antígeno fracionado Q5 apresenta ao *western blotting* apenas quatro bandas reconhecidas, sendo uma delas a mencionada exotoxina e, embora tenha demonstrado um efeito muito semelhante ao antígeno secretado total quanto à cinética e à diferenciação entre as linhagens bacterianas utilizadas, apresentou uma discreta polarização da resposta anticórpica para o perfil Th2, constatada pela elevada expressão de IgG1 e IgG2b, subclasses induzidas por citocinas do perfil Th2, como a IL-4. O antígeno secretado total (SeT1), que na cultura de células esplênicas induziu menor expressão desta citocina, proporcionou valores de DO maiores para a subclasse IgG2a, subclasse esta cuja produção é atribuída à ação de citocinas Th1. Estes achados são semelhantes aos relatados por Vale (2005).

Resultados distintos para o ELISA com antígeno secretado SeT1 foram encontrados por Cerqueira (2006), que estudando a avaliação da resposta humoral em caprinos infectados

com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* através de diferentes testes ELISA indiretos, observou que a linhagem atenuada e a selvagem apresentaram uma resposta humoral elevada quando comparadas pelo ELISA utilizando SeT1 como antígeno. Em contrapartida, quando comparadas pelo teste ELISA com a fração Q5 a linhagem selvagem desenvolveu um perfil de resposta bem superior, talvez por se tratar de um antígeno mais puro comparado com o antígeno secretado total. Apesar do ELISA com antígeno purificado diferenciar os animais infectados com as diferentes linhagens bacterianas (CERQUEIRA, 2006), o ELISA com antígeno SeT1 também apresentou expressiva capacidade de discriminar os grupos compostos por animais infectados, corroborando com os resultados obtidos por Carminati (2005).

A resposta humoral encontrada na infecção com a linhagem virulenta VD57 foi similar a observada por Vale (2005) na infecção experimental com a linhagem atenuada T1, onde se observou aumento na produção de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b com trinta dias de infecção, sendo que a produção de IgG2a aumenta ao longo do tempo. As diferenças das respostas imunes, celular e humoral existentes entre esses autores se devem, provavelmente, às diferentes concentrações e linhagens bacterianas utilizadas na infecção.

Tais resultados são coerentes com a relação estabelecida entre *C. pseudotuberculosis* e o seu hospedeiro, pois apesar do padrão intracelular de proliferação (PASCUAL *et al.*, 1995), produtos secretados por este microrganismo, como a exotoxina, são essenciais para o sucesso do parasitismo, cuja neutralização é feita especialmente por anticorpos (ZAKI, 1976). Estes achados também têm sido descritos na infecção por outros microrganismos onde mecanismos celulares e humorais são importantes para conter o processo patológico (DINIZ *et al.*, 2004).

8. CONCLUSÕES

- ✓ Diante da infecção com 10^2 UFC, a linhagem selvagem VD57 foi capaz de induzir uma expressiva ativação de componentes da resposta imune celular e humoral em modelo murino, sob a estimulação do antígeno secretado total (SeT1) e sua fração (Q5), quando comparada com o efeito induzido nas mesmas condições pela linhagem atenuada T1.
- ✓ Como o antígeno SeT1, a fração secretada Q5 possui estruturas antigênicas responsáveis pelo reconhecimento e ativação de componentes celulares e humorais da resposta imune. Entretanto, os resultados sugerem que esta última fração estimula predominantemente o perfil Th2, enquanto componentes presentes em SeT1 e ausentes na referida fração, deslocam o estímulo principalmente para o perfil Th1.
- ✓ A fração Q5 possui maior capacidade de estímulo à produção de TNF- α e IL-4, quando comparada com o antígeno SeT1. No entanto, a produção de INF- γ e IL-10 foi igualmente estimulada por ambos os antígenos.
- ✓ A resposta imune celular foi mais elevada aos 15 dias de infecção, para as duas linhagens bacterianas estudadas, entretanto, somente aos 35 dias de infecção com a linhagem selvagem observou-se produção de IgG e suas subclasses em resposta ao reconhecimento de ambos os antígenos.

- ✓ O reconhecimento de Q5 promoveu a produção de majoritária de IgG1, subclasse do perfil Th2, enquanto o reconhecimento de SeT1 resultou na produção de subclasses de ambos os perfis, entretanto com predomínio de IgG2a, subclasse típica do perfil Th1.

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LINCHTMAN, A.H.; PROBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. São Paulo: Elsevier. p. 251, 2005.

ALVES, F.S.F.; OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, n. 5, p. 69-75, 1999.

ANDERSEN, P.; ASKGAARD, D.; LJUNGQVIST, L.; BENNEDSEN, J.; HERON, I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. **Infect. Immun.**, n. 59, p. 1905-1910, 1991.

ANDERSON, M.; NAIRN, M.E. Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. **Colloques de L'INRA**, v. 28, p. 605-609, 1984.

ANDRADE, C.B. Avaliação da resposta immune do tipo celular em pacientes chagásicos, frente a frações antigênicas isoladas de *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de mestrado. Departamento de Imunologia – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz**, Salvador, 2002.

AUGUSTINE, J.L.; RENSHAW, H.W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47: p. 713-715, 1986.

AYERS, L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.171, n.12, p.1251-41,1977.

BATEY, R.G. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at a Western Australian abattoir. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 482-485, 1986a.

BATEY, R.G. SPEED, C.M.; KOBES, C.J. Prevalence and distribution of caseous lymphadenitis in feral goats. **Austr. Vet. J.**, v. 63, p. 33-36, 1986b.

BATTEY, Y.M.; TONGE, J.I. Human infection with *Corynebacterium ovis*. **The Medical Journal of Australia**, September, n. 28, p. 540-543, 1968.

BENHAM, C.L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **Commonwealth Bureau of Animal Health**, v. 32, p. 645-657, 1962.

BILLINGTON, S.J.; ESMAY, P.A.; SONGER, J. G. *et al.* Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 208, p. 41-45, 2002.

BRAITHWAITE, C.E.; SMITH, E.E.; SONGER, J.G.; REINE, A.H. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet. Microbiol.**, n. 38, p. 59-70, 1993.

BROGDEN, K.A.; CUTLIP, R.C.; LEHMKULH, H.D. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 45, p. 1532-1534, 1984a.

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

BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; ZOMETA, C.; ALVES, S.F. Serodiagnosis of inapparent caseous lymphadenitis in goats and sheep, using the synergistic hemolysis-inhibition test. **Am. J. Vet. Res.**, n. 47, p. 1461-1463, 1986.

BROWN, C.C., OLANDER, H.J.; ALVES, F.C. Synergistic Hemolysis-Inhibition Titers Associated with Caseous Lymphadenitis in a Slaughterhouse Survey of Goats and Sheep in Northeastern Brazil. **Can. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 46-49, 1987.

BURRELL D.H. Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. **Res. Vet. Sci.**, v. 24, p. 269-276, 1978.

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

BURRELLS, C.; INGLIS, N.F.; DAVIES, R.C.; SHARP, J.M. Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and *paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 45, p. 311-320, 1995.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. **Armed**, Porto Alegre, 2003.

CAMERON, C.M.; MINNAR, J.L. Immunization of mice against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Onderstepoort j. Vet. Res.** V. 36, p. 207, 1969.

CAMERON, C. M. Immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **J. S Afr. Vet Ass.**, v. 43, p. 345-349, 1972.

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. **Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia**, 2005.

CARNE, H.R. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. **Austr. Vet. J.** v. 4, p. 42-47, 1932.

CARNE, H.R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. **J. Pathol.**, v. 51, p. 199-212, 1940.

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

CERQUEIRA, R.B. Avaliação da resposta humoral de caprinos infectados com duas linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através de diferentes testes ELISA Indiretos. **Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia**, 2006.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Linfadenite caseosa. In: CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Cap. 21, p. 147-149, 1992.

COSTA FILHO, G.A. Particularidades da Linfadenite Caseosa dos caprinos em Pernambuco e no Nordeste. **Anais da escola Superior de Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco**. n. 1, p. 9-23, 1974.

DECKERT, M.; SOLTEK, S.; GEGINAT, G.; LUTJEN, S.; MONTESINOS-RONGEN, M.; HOF, H.; SCHLUTER, D. Endogenous interleukin-10 is required for prevention of a hyperinflammatory intracerebral immune response in *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4561-4571, 2001.

D'AFONSECA, V.; MORAIS, P. M.; DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G.; MEYER, R.; PORTELA, R.W.D. ; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. A description of genes corynebacterium pseudotuberculosis useful in diagnostics and vaccine applications.. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 252, 2008.

DINIZ, S.N.; REIS, B.S.; GOES, T.S.; ZOUAIN, C.S.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Protective immunity induced in mice by F0 and FII antigens purified from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 22, p. 485-492, 2004.

DORELLA, F. A. ; MEYER, R. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. . Vacinas e a Erradicação da Linfadenite Caseosa. **Journal of Brazilian Society of Microbiology (Online)**, v. 5, p. 26-31, 2008.

ELLIS, T.M.; SUTHERLAND, S.S.; WILKINSON, F.C. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of bacterium to other sheep. **Austr. Vet. J.**, v. 64, p. 261-263, 1987.

ELLIS, J. A.; LAIRMORE, M.D.; O'TOOLE, D.T.; CAMPOS, M. Differential induction of tumor necrosis factor alpha in ovine pulmonary alveolar macrophages following infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella haemolytica*, or Lentiviruses. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 3254-3260, 1991.

ELLIS, J. A., HAWK, D .A., MILLS, K. W., PRATT, D .L. Antigen specificity of antibody response to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 28, p. 289-301, 1991a.

ELLIS, J. A., HAWK, D. A., MILLS, K. W., PRATT, D. L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 28, p. 303-316, 1991b.

FIGUEIREDO, E.A.P.; SHELTON, M.; PANT, K.P. Goat skins. **Proceedings 3rd International Conference on Goat Production and Disease**. Tucson, Arizona, p. 488-490, 1982.

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.

FLYNN, J.L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; BLOOM, B.R. An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 2249-2254, 1993.

FORTUNE, S. M.; SOLACHE, A.; JAEJER, A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to INF- γ through myeloid differentiation factor 88-dependent and – independent mechanisms. **The Journal of Immunology**, v.172, p. 6272-6280, 2004.

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.

GRIFFITHS, E. Iron-regulated membrane proteins and bacterial virulence. **J. Biosci.**, v.15, n.3, p.173-77, 1990.

HARD, G.C. Electron microscopic examination of *Corynebacterium ovis*. **J. Bacteriol.**, v. 97, p. 1480-1485, 1969.

HODGSON, A.L.M.; BIRD, P.; NISBET, I.T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **J. Bacteriol.** V. 172, n. 3, p. 1256-1261, 1990.

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

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

HORWITZ, M.A.; HARTH, G.; DILLON, B.J.; MASLESA-GALIC, S. Recombinant Bacillus Calmete-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30Kda major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 97, p. 13853-13858, 2000.

JAIN-VORA, S.; LEVINE, A.M.; CHRONEOS, Z.; ROSS, G.F.; HULL, W.M.; WHITSETT, J.A. Interleukin-4 enhances pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4229-4236, 1998.

JOLIFF, G.; MATHIEU, L.; HAHN, V.; BAYAN, N.; DUCHIRON, F.; RENAUD, M.; SHECHTER, E.; LEBLON, G. Cloning and nucleotide sequence of the *csp1* gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of *Corynebacterium glutamicum*: the deduced N-terminal region of PS1 is similar to the *Mycobacterium* antigen 85 complex. **Mol. Microbiol.** v. 6, p. 2349, 1992.

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

JOLLY, R.D. Experimental infection of convalescent mice with *Corynebacterium ovis*. **New Zealand Vet. J.**, v. 13, p. 148-153, 1965b.

JOLLY, R.D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **J. Appl. Bact.**, v. 29, p. 189-196, 1966.

KANE, M. M.; MOSSER, D.M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 1141-1147, 2001.

KAUFMANN, S.H. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. **Immunol. Today.**, v. 9, p. 168-189, 1988.

KAUFMANN, S.H. Immunity to intracellular bacteria. **Ann. Ver. Immunol.**, v. 11, p. 129-163, 1993.

KAUFMANN, S.H.; HESS, J. Impact of intracellular and antigen display by intracellular bacteria: implication for vaccine development. **Immunology**, v. 65, p. 81-84, 1999.

KNIGHT, H.D. A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horse. **Cornell Vet.**, v. 68, p. 220-237, 1978.

LAN, D.T.B.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 42, n. 12, p. 863-870, 1998.

LAN, D.T.B.; MAKINO, S; SHIRAHATA, T.; YAMADA, M.; NAKANE, A. Tumor necrosis factor alpha and Gamma Interferon are Required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 61, n. 11, p. 1203–1208, 1999.

LIM, J. H.; KIM, H. J.; LEE, K. S.; JO, E. K.; SONG, C.H.; JUNG, S.B.; KIM, S.Y.; LEE, J.S.; PAIK, T.H.; PARK, J.K. Identification of the new T-cell-stimulating antigens from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. **FEMS Microbiology letters**, v. 232, p. 51-59, 2004.

LOGAN, K.E.; CHAMBERS, M.A.; HEWINSON, R.G.; HOGARTH, P.J. Frequency of IFN- γ producing cells correlates with adjuvant enhancement of bacille Calmette-Guèrin induced protection against *Mycobacterium bovis*. **Vaccine**, v. 23, p. 5526-5532, 2005.

LOPEZ, J.F.; WONG, F.M.; QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* first case of human infection. **Am. J. Clin. Pathol.**, n. 46, v. 5, p. 562-567, 1966.

MCINTYRE, T.M.; KLINMAN, D.R.; ROTHMAN, P.; LUGO, M.; DASCH, J.R.; MOND, J.J.; SNAPPER, C.M. Transforming growth factor β 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1031-1037, 1993.

MCNAMARA, P.J.; BRADLEY, G. A .; SONGER, J.G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decrease virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiol.**, v. 12, p. 921-930, 1994.

MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. **A Bacteriologia y Virologia Veterinária**. Editora Acribia, Zaragoza-España, 3^o Edição Espanhola-2^o Reimpressão, p 437, 1975.

MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. **Bacteriologia and Virologia Veterinária**. The Genus *Corynebacterium*, Ames, Iowa, USA, 7^a ed., cap. 32, p. 425-438, 1980.

MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: Aspectos da prevalência, da imunidade e do imunodiagnóstico. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia**, 2003.

MEYER, R.; REGIS, L.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAEER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gama production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, p. 249-254, 2005.

MODLIN, R.L.; HYATT, L.; WEISS, W. In situ characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 53, p. 17-28, 1983.

MOHAN, V.P.; SCANGA, C.A.; YU, K.; SCOTT, H.M.; TANAKA, K.E.; TSANG, E.; TSAI, M.C.; FLYNN, J.L.; CHAN, J. Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Host

Immune Response in Chronic Persistent Tuberculosis: Possible Role for Limiting Pathology. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1847-1855, 2001.

MOORE, K.W.; WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** v. 19, p. 683-765, 2001.

MOURA-COSTA, M.D.; CÂMARA, J.Q.; ROCHA, J.V.N.; MARTINEZ, T.C.N. Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia – Distribuição geográfica da doença. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador**, n. 12, v.1, p.1-7, 1973.

MOURA-COSTA, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, 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.

MUCKLE, C. A.; GYLES, C.L. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 1149-1153, 1983.

MUCKLE, C. A.; MENZIES, P. I.; LI, Y.; HWANG, Y. T.; VAN; WESENBEECK, M. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet. Microbiol.**, v. 30, p. 47-58, 1992.

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

NAKANE, A.; MINAGAWA, T.; KATO, K. Interactions between endogenous gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor in host resistance against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3439-3445, 1989.

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.

OSWALD, I. P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. 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.

PASCUAL, C.; LAWSON, P.A.; FARROW, J.A.; GIMENEZ, M.N.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 724-728, 1995.

PATON, M.W.; SUTHERLAND, S.S.; ROSE, I.R. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated sheep. **Aust. Vet. J.**, v. 72, p. 266-269, 1995.

PATON, M. W. The Epidemiology of caseous lymphadenitis in Australia and observations on other production systems. **Unit. Stat. Animal Health Association**, USA, p.18-24, 1997.

PAULE, B.J.A. Estudo de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e de suas interações com o hospedeiro caprino. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia**, 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.; SCHAER, 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. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L.F.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; REGIS, L.F.; VALE, V.L.C.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein expr. Purif.**, v. 34, n. 2, p. 311-316, 2004a.

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.; SCHAER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. SDS-PAGE and western blotting analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 3, n. 1, p. 44-52, 2004b.

PEEL, M.M.; PALMER, G.G.; STACPOOLE, A.M.; KERR, T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin. Infect. Dis.**, n. 24, v. 2, p. 185-191, 1997.

PÈNE, J.; ROUSSET, F.; BRIÈRE, F.; CHRÈTIEN, I.; BONNEFOY, J.Y.; SPITS, H.; YOKOTA, T.; ARAI, N.; ARAI, K.I.; BANCHEREAU, J.; VRIES, J.E. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E₂. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 6880-6884, 1988.

PÉPIN, M.; FONTAINE, J.J.; PARDON, P.; MARLY, J.; PARODI, A.L. Histopathology of early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Veterinary Microbiology**, v. 29, p. 123-134, 1991.

PÉPIN, M.; PITTET, J.; OLIVIER, M.; GOHIN, I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **J. Leukocyte Biol.**, v. 56, p. 666-670, 1994.

PÉPIN, M.; SEOW, H. F.; CORNER, L.; ROTHEL, J. S.; HODGSON, A.L. M.; 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. 149-163, 1997.

PÉPIN, M.; SANCHIS, R.; PATON, M. La Lymphadénite caséuse des ovins et des caprins. **Le Point Veterinaire**, v. 30, n. 196, p. 33-40, 1999.

PESTAKA, S.; KRAUSE, C.; SARKER, D. *et al.* Interleucina-10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 29-70, 2004.

POHL-KOPPE, A.; BALASHOV, K.E.; STEERE, A.C.; LOGIGIAN, E.L.; HAFLER, D.A. Identification of a T cell subset capable of both IFN- γ and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection. **The Journal of Immunology**, v.160, p.1804-1810, 1998.

QUINN, P. J., CARTER, M. E, MARKEY, B., CARTER, G. R. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, p.137, 1994.

REGIS, L. Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia**, 2001.

RIBEIRO, O.C.; SILVA, J.A.H.; MAIA, P.C.C.; CAMPOS, W.G. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. **Pesq. Vet. Bras.**, n. 8, p. 27-29, 1988.

ROJAS, M.; OLIVIER, M.; GROS, P.; BARRERA, L.F.; GARCIA, L.F. 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.

SNAPPER, C.M., MCINTYRE, T. M., MANDLER, R., PECANHA, L. M., FINKELMAN, F. D. Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J. Exp. Med.*175:1367-1371, 1997.

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

SONGER, J.G.; LIBBY, S.J; IANDOLO, J.J; CUEVAS, W.A. Cloning and expression of the phospholipase D gene of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, n. 58, v. 1, p. 131-136, 1990.

SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**, v. 5, p. 156-161, 1997.

SUTHERLAND, S.S. SPEIJERS, B.A. Comparison of the exotoxins of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Res. Vet. Sci.**, v. 47, p. 190-194, 1989.

TAKAHASHI, T.; MORI, Y.; KOBAYASHI, H.; OCHI, M.; KIKUCHI, N.; HIRAMUNE, T. Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine corynebacterial isolates based on the 16S rDNA sequence. **Microbiol. Immunol.**, n. 41, v. 9, p. 649-655, 1997.

TRAJKOVIC, V.; NATARAJAN, K.; SHARMA, P. Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins: a review. **Microbes and infection**, v. 6, p. 513-519, 2004.

TRINCHIERI, G. Regulatory role of T cells producing both interferon γ and interleukin 10 in persistent infection. **J. Exp. Med.** v. 194, n. 10, p. F53-F57, 2001.

TRINCHIERI, G.; SCOOT, P. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. **Res. Immunol.**, v. 146, p. 423-431, 1995.

UNANIAN, M.M., SILVA, A.E.D.F., PANT, K.P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. **Tropical Animal Journal Production**, v. 17, p. 57-62, 1985.

VALE, V.L.C. Reconhecimento de antígenos por caprinos naturalmente infectados e imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia**, 2001.

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; PAULE, B.; CARMINATI, R. BAHIA; MOURA-COSTA L.; SCHAEER, R.; NASCIMENTO, I.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Rev. Ciênc. 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 a linhagem T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia**, 2005.

WALKER, J.; JACKSON, H.; BRANDON, M.R.; MEEUSEN, E. Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 86, p. 13-18, 1991.

WALKER, J.; JACKSON, H.J.; EGGLETON, D.G.; MEEUSEN, E.N.T.; WILSON, M.J. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis, **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2562-2567, 1994.

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

YOZWIAK, M.L.; SONGER, J.G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **Am. J. Vet. Res.**, n. 54, p. 3392-3397, 1993.

ZAKI, M.M. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. **Res. Vet. Science**, v. 9, p. 498-493, 1968.

ZAKI, M.M. Relation between the toxogenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infected mice. **Research in Veterinary Science**, v. 20, p. 197-200, 1976.

ANEXO

A presente dissertação foi dividida em duas publicações: a primeira apresenta os resultados obtidos e aqui apresentados, através da utilização do antígeno secretado total SeT1, tendo sido submetida, à **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. A segunda publicação se encontra em fase final de redação e apresenta, além dos dados obtidos com a linhagem balb/c contidos neste relato, aqueles coletados em experimentos com outras linhagens de camundongos (CBA e suíça), mais resistentes à *C. pseudotuberculosis*.

**DIFFERENT PATTERNS OF IMMUNOACTIVATION IN BALB/c MICE BY TWO
STRAINS OF *Corynebacterium pseudotuberculosis***

GOMES, Ana Paula¹; RODRIGUES, Gabriele¹; VALE, Vera Lúcia^{1, 2}; MOURA-COSTA,
Lília Ferreira¹; SILVA, Marcos¹; LIMA, Danielle Dantas¹; SOUZA, Andrea¹; PORTELA,
Ricardo Wagner^{1*}; MEYER, Roberto¹

¹Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n,
Vale do Canela, Salvador, Bahia, CEP 40110-100, Brazil.

²State University of Bahia, Campus II, Alagoinhas, Bahia, CEP 48110-100, Brazil.

*Corresponding author: Instituto de Ciências da Saúde-UFBA, Avenida Reitor Miguel
Calmon, S/N Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brazil. 40.110-100. Phone: 55 (71) 3235-9682,
e-mail: rwportela@oi.com.br

SUMMARY

Caseous lymphadenitis is a chronic infectious disease that affects goats and sheep, and is caused by the facultative intracellular bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Little is known about the immunoreactivity of different bacterial strains and its secreted antigens. The objective of this work was to evaluate the recognition and activation of spleen cells from BALB/c mice inoculated with two different strains of *C. pseudotuberculosis*. The humoral and cellular responses were evaluated by the identification of specific immunoglobulins against the bacterial exotoxins and by the quantification of cytokines produced by splenocytes stimulated with secreted antigens. Results show that mice infected with the VD57 strain presented an extensive formation of granulomatous lesions, while T1 strain inoculated mice did not show any pathology associated with the bacteria. There was also a higher production of TNF-alpha, IFN-gamma and IL10 associated with VD57 infection, but there was no difference in the production of IL-4 between the two experimental groups.

Keywords: caseous lymphadenitis, BALB/c, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, cytokines, splenocytes,

1. INTRODUCTION

Caseous lymphadenitis is a chronic infectious disease that affects small ruminants and is caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a facultative, intracellular gram-positive pathogen, phylogenetically related to *Mycobacterium tuberculosis* (Pascual et al., 1995). The disease is widespread and has been previously been identified in goats and sheep from many regions, e.g. Europe, Australia, North and South America, Africa and Middle East (Robins et al., 1991; Paton et al., 2003).

Phospholipase D (PLD) has been identified as a potent exotoxin of *C. pseudotuberculosis* that plays a crucial role in the pathogenesis of the disease, and is present in all known strains recovered from infected mammalian species (Songer et al., 1988). Several pathological activities have been reported for PLD, including dermonecrosis (Muckle and Gyles, 1983), lethality (Brogden et al., 1990), synergistic red blood cell lysis when in the presence of *Rhodococcus equi* exotoxins (Fraser, 1961) and the inhibition of neutrophil chemotaxis (Yozwiak and Songer, 1993).

Nevertheless, secreted proteins produced by *Corynebacterium pseudotuberculosis* have also been reported to play an important role in the induction of a protective immune response (Burrells et al., 1995). But the immunity to the microorganism is complex, and involves both cellular and humoral responses (Ellis et al., 1990). Several authors point the Th1 cellular immune response as having major importance (Lan et al., 1999; Pepin et al., 1997; Eggleton et al., 1991). The humoral immunity is also important in the control of the *C. pseudotuberculosis* since this bacterium is a facultative intracellular pathogen (Batey, 1986), and, thus, mainly in the initial stages of infection, it becomes a target for antibodies. In this way, it has been

reported that PLD can induce the production of high titers of specific antibodies also being employed in immunodiagnostic assays (Menzies et al., 2004).

Considering the increasing importance of sheep and goat breeding, and the potential economic damage caused by this disease, the objective of this study was to evaluate the activation patterns of the secreted antigen of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in spleen cells of mice BALB/c experimentally infected with a wild and an attenuated strain of *C. pseudotuberculosis*, and the humoral response elicited by the infection with these two strains.

2. MATERIAL AND METHODS

Twenty-five BALB/c female mice, seven weeks old and gently ceded by Campinas State University (Unicamp) Animal Facilities, were used in this experiment. Ten animals were intra-peritoneally inoculated with 10^2 colony-forming units (CFU) of the attenuated strain T1 of *C. pseudotuberculosis* and another ten mice were infected with 10^2 CFU of VD57 wild strain. Another group of five animals were used as control, and were only inoculated with PBS 0.15M pH 7.4. At days fifteen and thirty-five after the first inoculation, five mice from each group were sacrificed in a CO₂ chamber, for spleen cells isolation. All animals of control group was sacrificed at day zero.

Two distinct strains of *C. pseudotuberculosis*, T1 (attenuated) and VD57 (wild), were used in this experiment. These strains came from the microorganism collection of the Institute of Health Sciences of the Federal University of Bahia and were isolated from goat's caseous granulomes found in the state of Bahia, and had their bacteriological identification confirmed

by commercially available biochemical tests (API CORYNE, Bio-Merieux SA, France). Bacteria were cultivated in brain–heart infusion (BHI) broth, at 37°C for 72 h.

In order to obtain excreted/secreted proteins of *C. pseudotuberculosis*, the strain T1 was cultivated in brain-heart infusion (BHI) broth, at 37°C for 72 h. The bacterial culture was centrifuged at 3,000 g at 4°C for 30 min. Ammonium sulfate at 30% was added to the culture supernatants at room temperature and the mixture was gently stirred. Subsequently, pH was adjusted to 4.0 and the same volume of n-butanol was added. The mixture was vortexed for 1 min. and allowed to rest for 1 h. Afterwards, the mixture was centrifuged at 1,350g for 10 min. and the interfacial precipitate was collected and dissolved in a small volume of Tris 20mM buffer, pH 7.4 (500 µL buffer/5 mL culture supernatant).

After sacrifice, mice spleen were retrieved for splenocytes isolation and washed twice with RPMI 1640 medium (Sigma) supplied with 1% streptomycin-penicillin (GIBCO). Spleens were macerated and cell suspension was transferred to a conical tube with 5 mL of the same re-suspension medium. Cells were counted in a Neubauer chamber and the number of viable cells was determined by Trypan Blue exclusion assay.

Spleen cells in a concentration of 10^6 cells/mL were cultivated in 24-well microculture plate in RPMI-1640 medium supplemented with 1% streptomycin-penicillin (GIBCO) and 15% of fetal calf serum (GIBCO). Cells were stimulated with 40 µg/mL of *C. pseudotuberculosis* secreted antigens, pokeweed mitogen 5 µg/mL (SIGMA) as positive control, and medium alone (negative control). The plates were incubated for 48 h. at 37° C in a 5% CO₂ incubator. Afterwards, the supernatant was collected, centrifuged, and kept at -20° C until use.

Cytokine profile analysis was performed using ELISA commercial kits for murine IFN-γ, IL-10, TNF-α and IL-4 (R&D Systems) according to manufacturer instructions.

An indirect ELISA was employed to detect the presence of specific immunoglobulins against *C. pseudotuberculosis*, as described by Carminati et al. (2004), with minor modifications. Briefly, micro-titer plates (Costar) were coated with 100µL/well of a supernatant from *C. pseudotuberculosis* culture in brain-heart infusion (BHI) broth, diluted at 1:100 in Carbonate-Bicarbonate buffer pH 9.6, and incubated overnight at 4°C. After one wash with PBS–Tween 0.05%, plates were blocked with 200µl/well of 5% powdered skim milk in PBS–T during 2 h. at 37°C. Plates were subsequently incubated with 50 µL of sera diluted 1:100 for 1 h. at 37°C. A pool of sera, from mice experimentally infected with a wild strain and presenting external lesions, was used as a positive control, and a non-infected mice pool sera was employed as a negative control. Plates were washed five times with PBS–T and incubated with 50µL of goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated (DAKO) diluted 1:10000 in 1% dry skimmed powder milk PBS–T for 1 h. at 37°C. Plates were then washed five times in PBS–T and developed with tetramethylbenzidine (SIGMA) for 20 min. The reaction was stopped with 25 µL of H₂SO₄ 4N. Optical density (OD) was measured at 450-620 nm with an ELISA plate reader (Bio-Tek Instruments, USA).

Results from concentrations of cytokines and the OD found for IgG detection were analyzed by non parametric test (ANOVA) using SPSS 12.0 software. Means were compared by the Tukey test and the Pearson's chi square test, and a p value <0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

During these experiments, all of the 25 animals inoculated with the VD57 *C. pseudotuberculosis* strain developed granulomatous lesions in superficial lymph nodes, and microbiological isolation confirmed the presence of *C. pseudotuberculosis*. None of the animals inoculated with T1 strain developed external lesions or presented any clinical sign of caseous lymphadenitis.

When the production of TNF-alpha was evaluated in a spleen cell culture, it was seen that levels of this cytokine were higher for cells retrieved from mice inoculated with the wild strain (Figure 1) and stimulated with secreted antigens. The peak of TNF-alpha was reached fifteen days after the inoculation, but remained higher and statistically different ($p < 0,05$) from T1 inoculated mice cells thirty-five days after the bacterial challenge, when it could also be seen that there was a small production of this cytokine by T1 mice spleen cells. No significant production of TNF-alpha was seen in non-stimulated cells.

A similar situation was found when IFN-gamma was evaluated. Splenocytes from mice inoculated with the VD57 strain produced high quantities of IFN-gamma at day 15 when stimulated, and this production was sustained until day 35 (Figure 2). Cells from mice inoculated with the attenuated strain produced low levels of interferon-gamma in all analyzed times. The same situation was found for IL-10 production (Figure 3)

Figure 4 represents the production of IL-4 by spleen cells from mice infected with the two *C. pseudotuberculosis* strains used in this experiment. Cells from inoculated animals presented a significant production of this cytokine in day 15 post infection, when compared to non-infected animals, but no statistical difference could be observed between VD57 and T1

infected animals. Also, in day 35 post infection, all patterns of IL-4 production were similar, with no statistical difference among them.

In Figure 5, the results of the indirect ELISA for the detection of specific immunoglobulins against *C. pseudotuberculosis* in sera from mice inoculated with T1 and VD57 strains are shown. It can be observed that fifteen days after the inoculation, there was a low production of specific immunoglobulins in both groups, but, for the group inoculated with the VD57 wild strain, there was an increase in day 35 post-challenge, but this production was highly variable in animals from this group, and the results are not statistically significant, when compared to the negative control. This increase did not happen in animals inoculated with the T1 attenuated strain.

Corynebacterium pseudotuberculosis induces a chronic disease, characterized by the formation of granulomas in lymph nodes of infected sheep and goats. The bacterium produces large amounts of secreted antigens, and PLD is one of the most important of these antigens, being able to induce a strong humoral response (Muckle et al., 1992). Most importantly, as this bacterium is a putative intracellular pathogen, the protective immune response against it is the cellular response (Lan, 1998).

In our experiments, we saw that TNF-alpha is largely produced fifteen days after the inoculation with the VD57 strain, while there was a smaller production of this cytokine in animals inoculated with T1 strain. Since TNF-alpha is a pro-inflammatory cytokine, involved in the process of chemotaxis, its production by VD57 inoculated animals is to be expected, since these animals developed granulomas, and this cytokine is fundamental to the formation of this type of lesion. Ly et al. (2008) have already described the importance of this cytokine in the formation of granulomatous lesions caused by *Mycobacterium tuberculosis* in guinea

pigs, finding high levels of TNF-alpha mRNA in the granulomes. Nevertheless, a similar situation was found by Ellis et al. (1995), who described the remarkable presence of TNF-alpha producing cells in pulmonary lesions caused by *C. pseudotuberculosis* in sheep.

IFN-gamma is another pro-inflammatory cytokine, related to the Th1 cellular response profile. Its participation in the pathogenesis of the disease in mice inoculated with *C. pseudotuberculosis* was already described by El-Enbaawy et al. (2005), who observed a significant production of IFN-gamma two weeks after the inoculation with a wild strain. A similar result was obtained in stimulated splenocytes from VD57 inoculated animals. Hence, in an experiment with leukocytes from infected mice stimulated with killed bacteria, Lan et al. (1999) was able to see a similar high production of IFN-gamma, and the inoculation of an anti-IFN-gamma antibody produced an exacerbation of the disease, as well as bacterial proliferation. Most of all, in the ovine and caprine model, it was seen that leukocytes from infected animals were able to produce high amounts of this cytokine when stimulated with bacterial specific antigens (Prescott et al., 2002; Paule et al., 2003; Meyer et al., 2005).

When considering IL-4, a cytokine related to the Th2 cellular response profile, our results showed a significant production of this cytokine in infected animals 15 days after inoculation, but not in day 35. These results do not agree with Pepin et al. (1997), who found low levels of IL-4 mRNA in sheep infected with three different lineages of *C. pseudotuberculosis*. This disagreement may be due to differences in inoculum concentration, strains characteristics, and/or animal models.

IL-10 is a regulatory cytokine, and is important in the modulation of the production of IFN-gamma and other pro-inflammatory cytokines induced by intracellular parasites (Pestka et al., 2004). In infection with *Mycobacterium bovis*, it has been seen that calves that presented a

high degree of lesions associated with the bacteria had a twofold less IL-10 expression than animals from the low pathology group (Thacker et al., 2007). These results are divergent from ours, since the T1 inoculated group, that did not present external lesions, had a low IL-10 production, and animals from the group inoculated with VD57 wild strain, with a high pathology degree associated with the bacteria, showed a remarkable production of this cytokine. This suggests that, even with a high production of this regulatory cytokine, it was not sufficient to reduce the production of IFN-gamma and the activation of macrophages, since the levels of IFN-gamma and TNF-alpha are high in splenocytes from animals with granulomatous lesions.

The humoral immune response against the two employed strains followed the same pattern as did the cellular response. The T1 strain was unable to induce a significant production of specific antibodies, while VD57 infected animals presented an increase in OD at day 35 after inoculation. However, no statistical significance was found, since individual results were extremely variable, and the standard deviation was high. This situation can be explained by the high pathological stage of the disease in this group. Animals in this group presented granulomatous lesions spread in many lymph nodes, causing a debilitating profile in these animals. Nevertheless, other authors were able to identify the humoral response in the mice model against *C. pseudotuberculosis*. El-Enbaawy et al. (2005) found a significant antibody production in BALB/c mice inoculated with a local strain of *C. pseudotuberculosis*, and also in mice inoculated only with toxoid or a combination of toxoid and killed bacteria.

The comparison between cytokines and antibodies profile from the two experimental groups shows that T1 was not able to induce a detectable immune-stimulation in BALB/c mice in the inoculums employed (10^2 CFU), since there is no significant production of any analyzed

cytokine. We do not know what the difference is that makes this strain non-pathogenic and incapable of inducing clinical lesions of caseous lymphadenitis. Previous results obtained by our laboratory showed that T1 strain of *C. pseudotuberculosis* produced a less intense synergistic hemolysis with *Rhodococcus equi*, when compared with a wild strain. It was also observed that T1 strain had a protective action against the challenge with a wild strain in goats (Moura-Costa et al., 2008).

The *C. pseudotuberculosis* VD57 strain infection in BALB/c mice induced an increased production of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10 and IL-4 by splenocytes, associated with an increased production of specific immunoglobulins, and the presence of granulomatous lesions. The T1 strain was not able to induce a detectable immunostimulation in this animal model in the inoculums employed, since there was a low production of TNF-alpha IFN-gamma and IL-10 by splenocytes. Also, there was no detectable production of specific antibodies against *C. pseudotuberculosis*, and the immune profile of this response was associated with no external or internal granulomatous lesions. Since BALB/c is a susceptible experimental model to *C. pseudotuberculosis*, the absence of lesions in these animals indicates that strain T1 can be seen as a promising vaccinal antigen.

4. REFERENCES

- BATEY, R.G. Aspects of pathogenesis in a mouse model of infection by *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.64, n.3, p. 237 – 249, 1986.
- BROGDEN, K.A.; ENGEN, R.L.; SONGER, J.G.; GALLAGHER, J. Changes in ovine erythrocyte morphology due to sphingomyelin degradation by *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase. **Microbial Pathogenesis** v.8, n.2, p. 157 - 162., 1990.
- BURRELLS, C.; INGLIS, N.F.; DAVIES, R.C.; SHARP, J.M. Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and *paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.45, n.3, p. 311 - 320, 1995.
- CARMINATI, R.C.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.F.; PAULE, B.J.A.; VALE, V.L.; REGIS, L.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Revista Ciências Médicas e Biológicas*, v.2, n.2, p. 88 - 93, 2003.
- EGGLETON, D.G.; MIDDLETON, H.D.; DOIDGE, C.V.; MINTY, D.W. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian Veterinary Journal**, v.68, n.10, p.317 - 319, 1991.

EL-ENBAAWY, M.I.; SAAD, M.M.; SELIM, S.A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Egyptian Journal of Immunology**, v.12, n.2, p.13 - 19, 2005.

ELLIS, J.A.; HAWK, D.A.; HOLLER, L.D.; MILLS, K.W.; PRATT, D.L. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.196, n.10, p.1609 - 1613, 1990.

ELLIS, J.A.; CAMPOS, M.; SNYDER, M.; CHELAK, B.; HAINES, D.M. Local production of tumor necrosis factor-alpha in corynebacterial pulmonary lesions in sheep. **Veterinary Pathology**, v.32, n.1, p.68 - 71, 1995.

FRASER, G. Hemolytic activity of *Corynebacterium ovis*. **Nature**, v.189, p.246, 1961.

LAN, D.T.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology Immunology**, v.42, n.12, p.863 - 870, 1998.

LAN, D.T.B.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; YAMADA, M.; NAKANE, A. Tumor necrosis factor alpha and Gamma Interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Journal of Veterinary Medicine Sciences**, v.61, n.11, p.1203 – 1208, 1999.

LY, L.H.; RUSSELL, M.I.; MCMURRAY, D.N. Cytokine profiles in primary and secondary pulmonary granulomas of Guinea pigs with tuberculosis. **American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology**, v.38, n.4, p.455 - 462, 2008.

MENZIES, P.I.; HWANG, Y.T.; PRESCOTT, J.F. Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, n.100, v. 1 – 2, p.129 - 137, 2004.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.107, n.3 – 4, p.249-254, 2005.

MOURA-COSTA, LF.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; VALE, V.L.C.; PAULE, B.J.A.; PORTELA, R.W.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L.M.S.; 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 Immunopathology**, v.126, n.1 – 2, p.131-141, 2008.

MUCKLE, C.A.; GYLES, C.L. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **American Journal of Veterinary Research**, n.44, v.6, p.1149 - 1153, 1983.

MUCKLE, C.A.; MENZIES, P.I.; LI, Y.; HWANG, Y.T.; VAN WESENBEECK, M. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v.30, n.1, p.47 - 58, 1992.

PASCUAL, C.; LAWSON, P.A.; FARROW, J.A.; GIMENEZ, M.N.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n.4, p.724 - 728, 1995.

PATON, M.W.; WALKER, S.B.; ROSE, I.R.; WATT, G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**, v.81, n. 1 – 2, p.91 - 95, 2003.

PAULE, B.J.A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L.F.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.C.; VALE, V.L.C.; MOURA-COSTA, L.F.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-g production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.96, n.3 – 4, p.129–139, 2003.

PÉPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; ROTHHEL, 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. **Veterinary Research**, v.28, n.2, p.149 - 163, 1997.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; WALTER, M.R.; SHI, Y.; FISHER, P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Reviews of Immunology**, v.22, p.929 - 979, 2004.

PRESCOTT, J.F.; MENZIES, P.I.; HWANG, Y.T. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Veterinary Microbiology**, v.88, n.3, p.287 - 97, 2002.

ROBINS, R. Focus on caseous lymphadenitis. **State Veterinary Journal**, v.1, p.7 – 10, 1991.

SONGER, J.G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M.M.; OLSON G.B.; KELLEY L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal Veterinary Research**, v.49, n.2, p.223 - 226, 1998.

THACKER, T.C.; PALMER, M.V.; WATERS, W.R. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.119, n. 3 – 4, p.204 - 213, 2007.

YOZWIAK, M.L.; SONGER, J.G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.3, p.392 – 397, 1993.

FIGURES

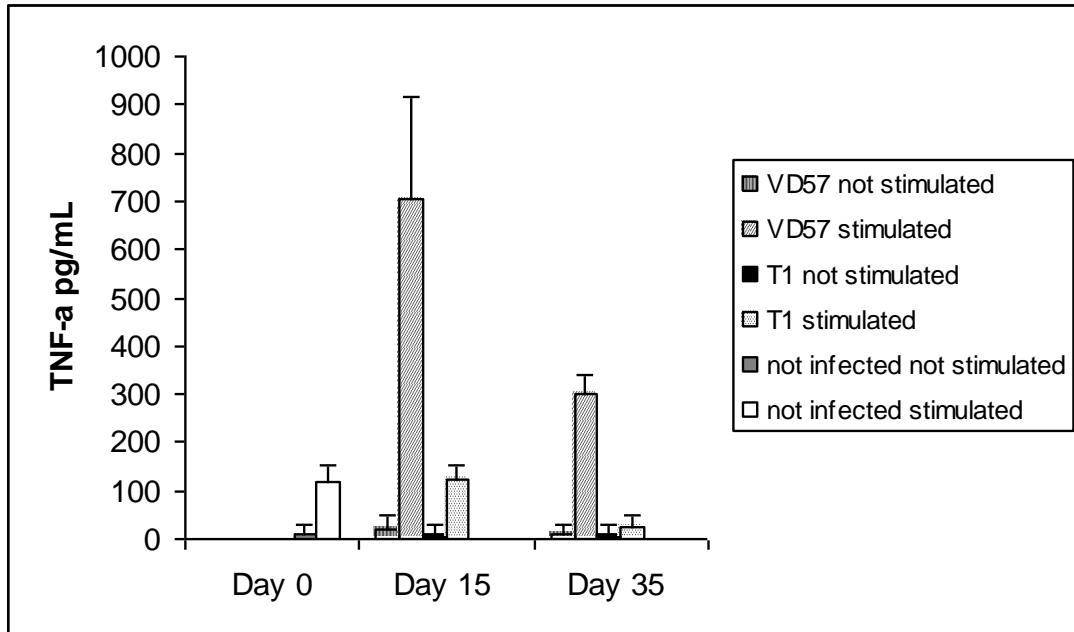


Figure 1 – In vitro production of TNF-alpha by spleen cells of mice inoculated with VD57 and T1 strains of *C. pseudotuberculosis*, and stimulated with bacterial secreted antigens. Results express the means of two independent experiments. Symbol * represents the statistical difference between two inoculated groups at $p > 0.05$, as defined by Pearson's chi square test.

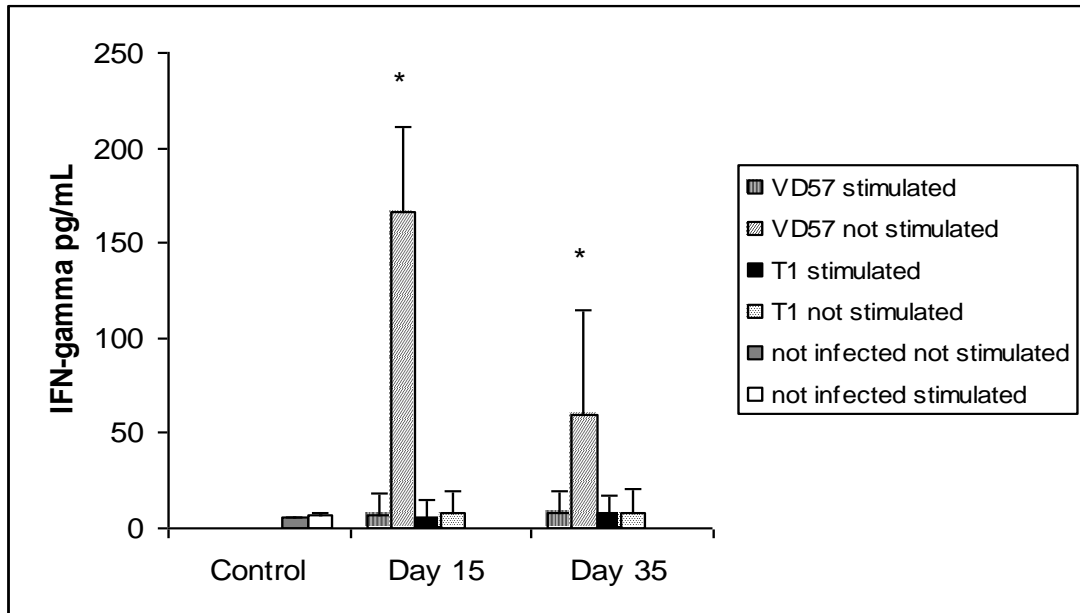


Figure 2 - In vitro production of IFN-gamma by spleen cells of mice inoculated with VD57 and T1 strains of *C. pseudotuberculosis*, and stimulated with bacterial secreted antigens. Results express the means of two independent experiments. Symbol * represents the statistical difference between two inoculated groups at $p > 0.05$, as defined by Pearson's chi square test.

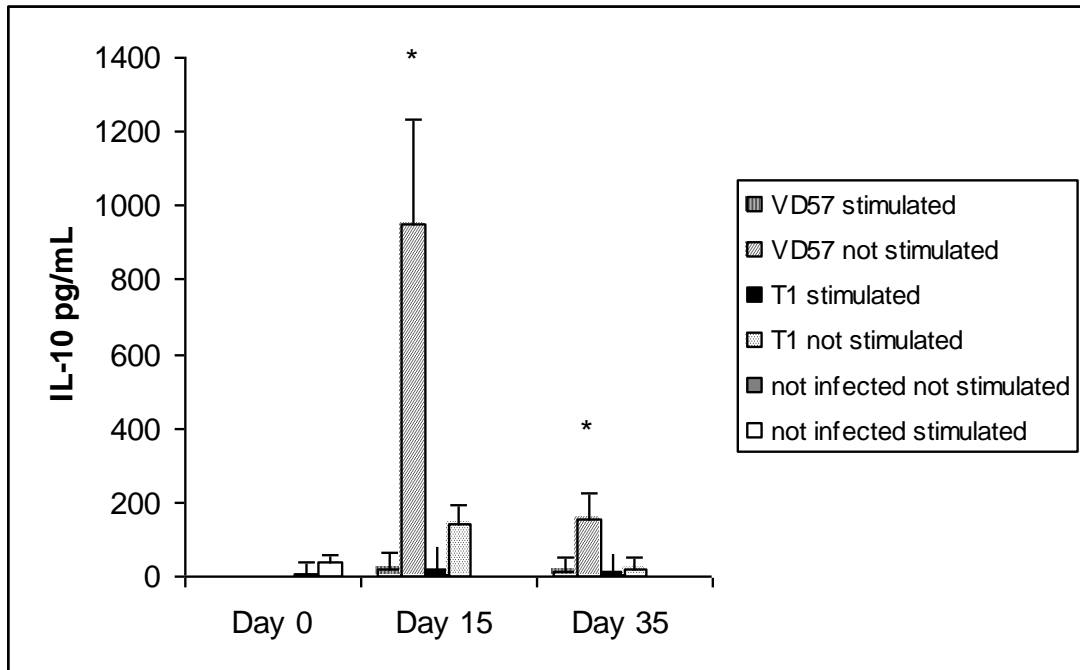


Figure 3 - In vitro production of IL-10 by spleen cells of mice inoculated with VD57 and T1 strains of *C. pseudotuberculosis*, and stimulated with bacterial secreted antigens. Results express the means of two independent experiments. Symbol * represents the statistical difference between two inoculated groups at $p > 0.05$, as defined by Pearson's chi square test.

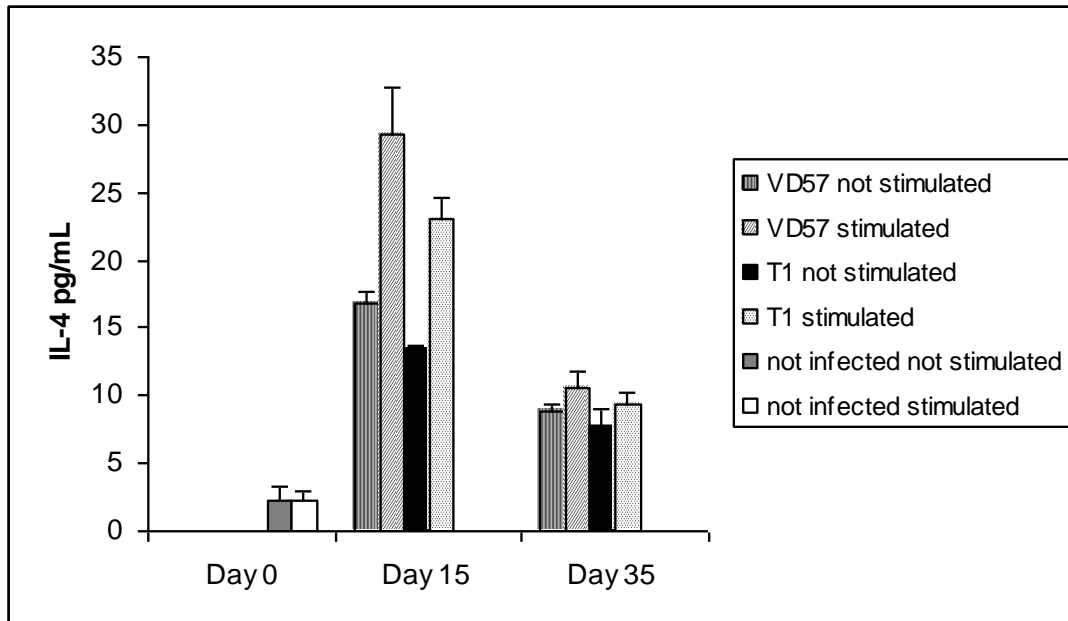


Figure 4 - In vitro production of IL-4 by spleen cells of mice inoculated with VD57 and T1 strains of *C. pseudotuberculosis*, and stimulated with bacterial secreted antigens. Results express the means of two independent experiments. There was a statistical difference among inoculated and control groups, but no significant difference could be observed between VD57 and T1 infected animals.

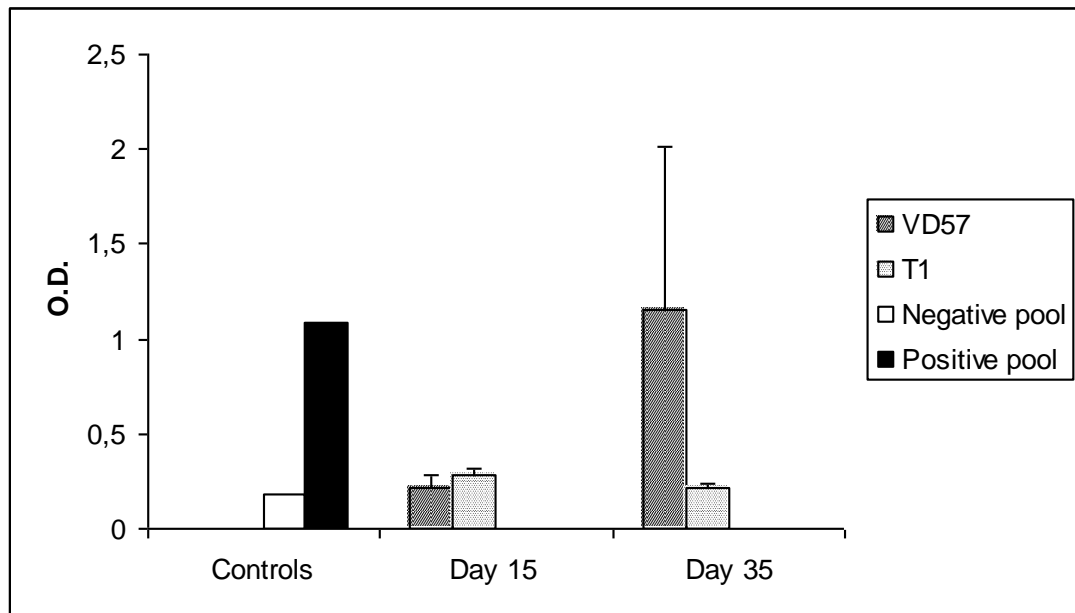


Figure 5 – Production of specific immunoglobulin G against *C. pseudotuberculosis* in BALB/c mice inoculated with the VD57 and T1 strains. Results express the means of two independent experiments.