



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



## **TRABALHO DE TESE**

**HEIDIANE ALVES DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE DE  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM UMA CEPA  
SELVAGEM *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ER1409, SOB  
ESTÍMULO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES rPLD,  
rCP40, rPKnG, rCP5582, rCP7041 DESTA BACTÉRIA.**

Salvador-BA  
2017

**HEIDIANE ALVES DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE DE  
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM UMA CEPA  
SELVAGEM *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ER1409, SOB  
ESTÍMULO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES rPLD,  
rCP40, rPKnG, rCP5582, rCP7041 DESTA BACTÉRIA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientador: Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Coorientadora: Dra. Vera Lúcia Costa Vale

Salvador-BA  
2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Alves dos Santos, Heidiane  
AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS  
INFECTADOS COM UMA CEPA SELVAGEM *Corynebacterium*  
*pseudotuberculosis*, ER1409, SOB ESTÍMULO DOS ANTÍGENOS  
RECOMBINANTES rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582, rCP7041 DESTA  
BACTÉRIA. / Heidiane Alves dos Santos. -- Salvador, 2017.  
96 f. : il

Orientador: Roberto José Meyer.

Coorientadora: Vera Lúcia Costa Vale.

Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em Imunologia -  
Doutorado) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde - UFBA, 2017.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2. Linfadenite  
Caseosa. 3. Antígenos Recombinantes. 4. MAPK. I. Meyer, Roberto  
José. II. Vale, Vera Lúcia Costa . III. Título.

## AGRADECIMENTOS

**Agradeço a Deus** por me guiar, por todos os desafios superados e pelas grandes vitórias na vida;

**À minha Família** Base de tudo que sou hoje;

**À minha mãe, Leonice**, pelo amor incondicional e apoio em todas as minhas atitudes. E ao **meu pai, Francisco** (*in memoriam*), que estaria certamente muito orgulhoso de minha evolução profissional;

**Aos meus irmãos**, em especial minha irmã Flávia pelo apoio em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis sempre me encorajando e orgulhando-se de minhas vitórias;

**Ao meu Orientador**, Prof. Dr. Roberto Meyer, por quem tenho muito respeito e admiração, pelos ensinamentos, pelo empenho na idealização e realização desse trabalho;

**À minha Coorientadora**, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Vale, pela pessoa especial que é contribuindo brilhantemente para minha formação profissional e desenvolvimento científico, desde a minha graduação, transmitindo sabiamente seus ensinamentos;

**À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Soraya Trindade**, pelo apoio, dedicação, extrema competência e valiosa contribuição para o desenvolvimento desse trabalho;

**Aos demais professores** do Labimuno / PPGIm pelo apoio e questionamentos sobre as ideias apresentadas, que contribuíram para nortear este trabalho;

**À amiga Dilcéia**, secretária do PPGIm, pela paciência em me atender sempre que precisei;

**Aos Companheiros de jornada**, parceiros de todas as horas, sem os quais este trabalho não seria possível, Andréia Pacheco, Tatiane Sales, Ioná Brito, Thaís Brito, Marcos Costa, Milton Galdino, José Tadeu, Rogério Reis, Geraldo Pedral, Victória Christiane, Ceíça, Mariana Assis (*in memoriam*), pela amizade e apoio fundamentais à realização deste trabalho;

**Aos alunos de Iniciação Científica**, pela dedicação, apoio e prestabilidade de sempre na realização deste trabalho;

**À família do Labimuno**: Dona Chica, Sr.Manuel, Sr.José e Sr. Mário, Rafaela, Zilda, Luciane, pela amizade, e apoio sempre presentes.

**Aos meus amigos**, sempre presentes na minha vida, mesmo nas ausências, me encorajando na superação dos desafios;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

"Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho".

Dalai Lama

ALVES-SANTOS, H. **Avaliação de aspectos da resposta imune de camundongos infectados com uma cepa selvagem *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ER1409, sob estímulo dos antígenos recombinantes rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582, rCP7041 desta bactéria.** Salvador, Bahia, 93p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Programa de Pós Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, 2017.

## RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma enfermidade que afeta principalmente caprinos e ovinos, cujo agente etiológico é *Corynebacterium pseudotuberculosis*. É caracterizada pela formação de granulomas em linfonodos externos e internos, vísceras e órgãos como os pulmões, rins e fígado. A disseminação da linfadenite caseosa nos rebanhos é expressiva e o prejuízo é significativo com perdas econômicas evidentes. Vacinas comerciais disponíveis não oferecem proteção adequada aos animais. Os processos do hospedeiro que são inibidos por bactérias patogênicas incluem a fusão do fagossoma com lisossomos, apresentação de antígenos, a apoptose e a estimulação de respostas bactericidas, devido à ativação de vias de sinalização envolvendo proteína quinases ativadas por mitógeno (MAPKs). Estudos acerca da patogênese da LC indicam que a indução das respostas imunes humoral e celular são fundamentais para o controle da infecção. A compreensão e caracterização das proteínas bacterianas responsáveis pela indução da resposta imune do hospedeiro se faz necessária para o entendimento da dinâmica da infecção. O presente estudo objetivou investigar o envolvimento das vias MAPK (MAPK p38, ERK 1 e 2, e JNK 1,2,3) na resposta imunológica de camundongos infectados, sob estímulo de antígenos recombinantes desta bactéria, através da avaliação dos níveis de Óxido Nítrico, e dos padrão de expressão de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e FOXP3<sup>+</sup>, durante um período de 30 dias de infecção com cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Os camundongos Swiss (n = 12) foram divididos em dois grupos, um deles foi infectado com 10<sup>2</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) de estirpe virulenta ER1409 e outro controle (sem infecção). Os esplenócitos murinos foram tratados com inibidores específicos (inibidor de MAPK p38, inibidor ERK 1/2 ou inibidor da JNK 1, 2,3) e cultivadas sob estímulo dos antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* (rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582-G04-, rCP7041-G10). A análise demonstra diferenças nos níveis de NO entre os grupos (controle X infecção) nas condições de cultivo empregadas: branco (células), estímulos e inibidores das vias MAPK (p<0,001). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de NO entre os inibidores das vias MAPK p38, ERK 1 / 2 e JNK 1, 2 e 3 em nenhuma das situações analisadas. Com relação à produção de IgG, os níveis mais expressivos de subclasses desta imunoglobulina produzidas com 30 dias de infecção foram IgG2a e IgG2b, sem diferença estatisticamente significativa entre os animais infectados e controles. Pôde-se observar também que para os marcadores CD3/CD4<sup>+</sup> houve diferença entre os grupos (controle e infecção) apenas quando o antígeno G04 (rCP5582) foi usado como estímulo (p=0,011). No entanto não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do marcador FOXP3 entre os grupos (controle e infecção) em nenhum dos estímulos / inibidores utilizados.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Linfadenite caseosa, Antígenos recombinantes, MAPK.

ALVES-SANTOS, H. Avaliação da resposta imune de camundongos infectados com uma cepa selvagem *C. pseudotuberculosis*, ER1409, sob estímulo dos antígenos recombinantes rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582, rCP7041 desta bactéria. Salvador, Bahia, 93p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Programa de Pós Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, 2017.

### ABSTRACT

Caseous lymphadenitis (CL) is a disease that primarily affects in ovine goats, with etiological agent *Corynebacterium pseudotuberculosis*. It is characterized by the formation of granulomas in external and internal lymph nodes, and organs such as the lungs, kidneys and liver. The CL in the herds is significant and the loss is significant with evident economic losses. Commercial vaccines available not available for animals. Host processes that are inhibited by pathogenic bacteria include a fusion of phospho-mycososomes, antigen presentation, apoptosis, and bactericidal stimulation, due to the activation of signaling pathways involving mitogen-activated kinases (MAPKs). Studies on the pathogenesis of CL indicate that the induction of humoral and cellular immune responses are fundamental for the control of the infection. The present study aimed to investigate the involvement of the MAPK pathways (MAPK p38, ERK 1 and 2, and JNK 1,2,3) in the immunological response of infected mice under stimulation of recombinant antigens of this bacterium through the evaluation of Nitric Oxide levels, And the expression pattern of CD4 +, CD8 + and FOXP3 + cells during a 30-day period of infection with virulent *C. pseudotuberculosis* strain. Swiss mice (n = 12) were divided into two groups, one of which was infected with 10<sup>2</sup> colony-forming units (CFU) of virulent strain ER1409 and another control (no infection). Murine splenocytes were treated with specific inhibitors (inhibitor of p38 MAPK, ERK 1/2 inhibitor or JNK inhibitor 1,2,3) and cultured under stimulation of the recombinant antigens of *C. pseudotuberculosis* (rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582-G04 -, rCP7041-G10). The analysis demonstrates differences in NO levels between the groups (control and infection) in the culture conditions employed: white (cells), stimuli and inhibitors of MAPK pathways (p < 0.001). However, there was no statistically significant difference in NO levels between the inhibitors of MAPK p38, ERK 1/2 and JNK 1, 2 and 3 in any of the situations analyzed. Regarding IgG production, the main subclasses of this immunoglobulin produced during the 30 days of infection were IgG2a and IgG2b, a statistically significant difference between the infected and control animals. It was also observed that for CD3 / CD4 + markers there was a difference between the groups (control and infection) only when the G04 antigen (rCP5582) was used as a stimulus (p = 0.011). However, there was no statistically significant difference in the expression of the FOXP3 marker between the groups (control and infection) in any of the stimuli / inhibitors used.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, recombinant antigens, MAPK.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Principais cascatas de MAPK em células de mamíferos.....	38
Figura 2	Esquema descritivo da cascata de sinalização MAPK.....	39
Figura 3	Desenho esquemático de eletroforese em gel dos antígenos recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	58
Figura 4	Nível de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de esplenócitos murinos tratados com os inibidores da MAPK p38, ERK 1 / 2 e JNK 1, 2 e 3 sob estímulo dos antígenos recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	62
Figura 5	Níveis de IgG total e suas subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em camundongos 30 dias após infecção com a linhagem virulenta ER1409.....	72
Figura 6	Média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4+ e T CD8+ em camundongos Swiss controles e 30 dias de infecção, estimulados com os antígenos recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582 (G04), rCP7041 (G10).....	74
Figura 7	Níveis de FOXP3 em células esplênicas murinas sob estímulo dos antígenos recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582 (G04), rCP7041 (G10).....	76



## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHI	Brain-heart Infusion
C	<i>Corynebacterium</i>
CP	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
CD	“Cluster of Differentiation” – Marcadores celulares
CP40	Serina protease corinebacteriana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
Fag A	Proteína integral de membrana
Fag B	Transportador de ferro-enterobactina
Fag C	ATP-proteína de ligação da membrana
Fag D	Proteína de ligação a sideróforos
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
FOXP3	Fator de transcrição <i>forkhead</i> box P3
HCl	Ácido Clorídrico
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
JNK	c-Jun N-terminal kinases
kDa	Quilodalton
LC	Linfadenite Caseosa
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Média de intensidade de fluorescência
NanH	Neuraminidase H
NK cell	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato com salina
PBS-T	Tampão fosfato com salina e Tween 20 (detergente)
Pg	Pictogramas
pH	Potencial hidrogeniônico

PKnG	Proteína quinase G
PLD	Fosfolipase D
rCP	Proteína recombinante de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
RPM	Rotações por minuto
SpaC	Proteína de ponta tipo <i>pili</i>
SPSS	“Statistical Package for Social Sciences” – Programa Estatístico para Ciências Sociais
SodC	Superóxido Dismutase C
LT CD4	Linfócito T expressando a molécula CD4 na superfície
LT CD8	Linfócito T expressando a molécula CD8 na superfície
TB	Tuberculose
Th1	Resposta imune celular com perfil 1
Th2	Resposta imune celular com perfil 2
Th17	Resposta imune celular com perfil 17
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
Tregs	Células T Regulatórias
UFC	Unidades formadoras de colônia

## SUMÁRIO

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2.0</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MICROORGANISMO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>ASPECTOS GERAIS DA INFECÇÃO POR <i>C. pseudotuberculosis</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Linfadenite caseosa.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Dados epidemiológicos e Econômicos.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Transmissão da Infecção.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Diagnóstico e Tratamento.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Patogenia .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Resposta Imune a <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Fosfolipase D (PLD).....</b>	<b>29</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Parede celular lipídica.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Proteínas secretadas pelos genes <i>Fags A,B,C,D</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.4</b>	<b>CP40.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.5</b>	<b>Novos Alvos Antigênicos</b>	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>VACINAS COMO FERRAMENTA NO CONTROLE DA LC</b>	<b>32</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Avaliação de eficácia.....</b>	<b>35</b>
<b>2.6</b>	<b>PROTEÍNAS KINASES ATIVADAS (MAPKS): MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>3.0</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.0</b>	<b>DELINEAMENTO DA TESE.....</b>	<b>41</b>
<b>5.0</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>42</b>
	<b>MANUSCRITO 01 (Revisão)</b>	<b>43</b>
	<b>Potenciais Fatores de Virulência e Alvos Antigênicos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i></b>	
	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>44</b>
	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>45</b>
	<b>ESTADO DA ARTE.....</b>	<b>45</b>
	<b>PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>C. pseudotuberculosis</i> ..</b>	<b>45</b>
	<b>NOVOS ALVOS ANTIGÊNICOS DE <i>C. pseudotuberculosis</i>.....</b>	<b>46</b>

CP40 (endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase).....	47
Proteína quinase G (PknG).....	48
SpaC Pilina.....	50
Neuraminidase H (NanH).....	51
SodC (Superóxido Dismutase C).....	51
Antígenos recombinantes rCP5582 e rCP7041.....	52
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>53</b>
<b>MANUSCRITO 02</b>	<b>54</b>
<b>Avaliação do papel das vias ERK 1 / 2 , MAPK p38 e JNK 1 , 2 e 3 na Produção de Óxido Nítrico em Esplenócitos de Camundongos Infectados sob Estimulo de Antígenos Recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i>.</b>	
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAIS E MÉTODOS .....	56
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
<b>MANUSCRITO 03</b>	<b>65</b>
<b>Avaliação da Produção de Imunoglobulina G, suas subclasses e da expressão dos marcadores CD3/CD4+, CD3/CD8+ e FOXP3 em Células Esplênicas Camundongos Infectados com a Linhagem Selvagem ER1409 de <i>C. pseudotuberculosis</i>, estimulados com Antígenos Recombinantes desta Bactéria.</b>	
INTRODUÇÃO.....	66
MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>78</b>
ANEXO A .....	96

## 1.0 INTRODUÇÃO GERAL

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo de macrófagos que se destaca na pecuária mundial por ser o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) em caprinos e ovinos. A incidência da LC é relatada em diversos países, como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá e Brasil (AL-RAWASHDEH & AL-QUDAH, 2000; CONNOR *et al.*, 2000; BEN SAID *et al.*, 2002; BINNS *et al.*, 2002; ARSENAULT *et al.*, 2003; PATON *et al.*, 2003).

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto contagiosa crônica, transmitida principalmente através da pele, acomete pequenos ruminantes, é caracterizada pela formação de granulomas em linfonodos externos e internos e em vísceras como os pulmões, rins e fígado (BAIRD & FONTAINE, 2007; KURIA *et al.*, 2001; PEKELDER, 2000; SMITH & SHERMAN, 1994; SOARES, VIANA & LEMOS, 2007). A disseminação da linfadenite caseosa nos rebanhos é expressiva e o prejuízo é significativo com perdas econômicas evidentes.

A resistência adaptativa à infecção causada por bactérias intracelulares facultativas tais como *C. pseudotuberculosis*, está relacionada às células T CD4<sup>+</sup> e, mais especificamente, aos clones que produzem as citocinas de tipo Th1, principalmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas pró-inflamatórias aumentam a atividade bactericida de macrófagos e ativar linfócitos T CD8<sup>+</sup> (SILVA, *et al.*, 2001; VALE, *et al.*, 2016).

A dinâmica da resposta imunológica à infecção só pode ser compreendida se houver a caracterização das proteínas bacterianas responsáveis pela indução da resposta imune do hospedeiro (SEYFFERT *et al.*, 2011) assim como estudos para determinação de condições apropriadas para indução de resposta imune à antígenos, incluindo a definição de adjuvantes, vias de administração e protocolos de imunização, os quais são importantes no aperfeiçoamento de uma vacina eficaz (ABATH *et al.*, 1998; COSTA, 2002; GRIFFIN, 2002).

Os processos do hospedeiro que são inibidos por bactérias patogênicas incluem a fusão do fagossoma com lisossomos, apresentação de antígenos, a apoptose e a estimulação de respostas bactericidas, devido à ativação de vias de sinalização envolvendo proteína quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (KRACHLER *et al.*, 2011).

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) são uma subfamília de proteínas cinases específicas de serina / treonina. MAPKs são expressas por todos os tipos de

células e respondem a estímulos extracelulares (mitógenos) que medeiam a transdução de sinal desde os receptores da superfície celular aos núcleos (NUMAZAWA *et al.*, 2003; SON *et al.*, 2011). As MAPKs fazem parte de um sistema de fosforilação em que três cinases são ativadas seqüencialmente (BOUTROS *et al.*, 2008; JOHNSON e LAPADA, 2002), são expressas em células de mamíferos e traduzem sinais em resposta a fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e condições de stress. (SOUZA, *et al.*, 2014)

Visando a busca de antígenos imunoprotetores de *C. pseudotuberculosis* o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (Labimuno) do Instituto de Ciências da Saúde – ICS/UFBA, o qual possui uma linha de pesquisa relacionada ao estudo do *Corynebacterium pseudotuberculosis* desde 1990, se concentrou em estudar a resposta imune estimulada pelo patógeno em caprinos inoculados experimentalmente (MEYER *et al.*, 2002, 2005; PAULE *et al.*, 2003, SOUZA *et al.*, 2014, VALE, *et al.*, 2016) e determinar quais as proteínas antigênicas que são reconhecidas pelo organismo animal e que constituem potenciais imunógenos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (VALE *et al.*, 2003; MEYER *et al.*, 2005; PAULE *et al.*, 2004a; PAULE *et al.*, 2004b). Contudo, apesar da identificação de diversas moléculas imunogênicas, essas proteínas ainda não foram caracterizadas, o que dificulta a sua utilização.

Ao estudar os mecanismos de virulência que patógenos utilizam para propagarem-se em um hospedeiro não só indica potenciais alvos para o tratamento, mas também muitas vezes fornece “*insights*” sobre as moléculas do hospedeiro afetadas.

Neste contexto, o estudo da resposta imune de esplenócitos de camundongo infectados por *C. pseudotuberculosis* virulenta e estimulados por proteínas recombinantes desta bactéria, assume especial importância, uma vez que ainda pouco se sabe sobre a interação de *C. pseudotuberculosis* e seu hospedeiro.

Neste trabalho utilizou-se esplenócitos de camundongos *Swiss* para avaliar o potencial envolvimento das vias de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos na indução de produção de óxido nítrico, sob estímulo das proteínas recombinantes rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582, rCP7041 de *C. pseudotuberculosis*, bem como a proliferação de Linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, células Treg FOXP3<sup>+</sup>.

## 2.0 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MICROORGANISMO

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) em ovinos e caprinos é um bacilo pequeno (1-3 µm de comprimento x 0,5-0,6µm de diâmetro), Gram positivo, não esporulado, pleomórfico em lesões naturais, anaeróbia facultativa, sendo um parasita intracelular facultativo que se multiplica no interior de macrófagos (Fontaine e Baird, 2008; Hoelze, 2013). O patógeno também é causador de linfangite ulcerativa em equinos e de diversas outras doenças supurativas em outros mamíferos, incluindo o homem (Ventura *et al.*, 2007; Pacheco *et al.*, 2011), o que lhe confere um importante e significativo potencial zoonótico (BASTOS, 2012).

O gênero *Corynebacterium* é composto por 50 espécies, algumas das quais podem ser patogênicas para animais e plantas. Este gênero pertencente ao grupo CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia*) juntamente com *Rhodococcus* (HARD, 1975; SONGER *et al.*, 1988; SONGER, 1997; PAULE *et al.*, 2004), é um grupo heterogêneo mas com características diferenciadas, tais como uma parede celular peculiar composta por ácido micólico e arabinogalactose e um alto conteúdo de guanina e citosina (47-74%) em seu genoma (GARG *et al.*, 1985; GOODFELLOW, 1989; FUNKE *et al.*, 1995; NAVAS, 1996; DORELLA *et al.*, 2006).

Essa bactéria é classificada em dois biovars (Biberstein *et al.*, 1971), o biovar *ovis* que afeta principalmente ovinos e caprinos causando abscessos superficiais e viscerais, e o biovar *equi*, que afeta principalmente equídeos, causando linfangite ulcerativa das extremidades distais, abscessos ventral do tórax e abdômen, e furunculose (Connor *et al.*, 2000). A existência desses dois biovars foi confirmada por técnicas moleculares (Sutherland *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 2007).

A classificação fenotípica de *C. pseudotuberculosis* é fundamentada nas características de cultivo microbiano e em provas bioquímicas (LEARDINI *et al.*, 2002). As condições ótimas para seu crescimento são temperatura a 37°C com pH variando entre 7,0 e 7,2 (Benham *et al.*, 1962; Merchant & Packer, 1975), mas de acordo com Batey (1986a) pode crescer bem em uma faixa de pH de 7,0-8,0. *C. pseudotuberculosis* é um organismo exigente do ponto de vista nutricional, crescendo bem em meios enriquecidos como ágar sangue, infusão de cérebro e coração (BHI) ou meio ágar enriquecido com soro animal. Seu cultivo em meio BHI melhora quando é complementado com extrato de levedura, triptona ou

lactalbumina (Cameron & Swart, 1965). Seu crescimento em meio de cultura sólido começa inicialmente na superfície do ágar e, em seguida, torna-se organizado em grupos ou em paliçada, assumindo uma coloração creme amarelada; as colônias são secas, opacas e concentricamente aneladas, que após vários dias de incubação podem chegar a 3 mm de diâmetro (QUINN et al., 1994).

Algumas características bioquímicas foram propostas para identificar *C. pseudotuberculosis* dentro do grupo das corinebactérias: a atividade pirazinamidase negativa, própria de *C. pseudotuberculosis*, *C. diphteriae* e *C. ulcerans*, as atividades urease e fosfolipase D positivas, próprias de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* e a atividade de fermentação do amido (ROGOSA e outros 1974; BARKSDALE e outros 1981; MUCKLE E GYLES, 1982). Desta forma, esta bactéria é caracterizada bioquimicamente pela produção de catalase, fosfolipase D, uréase e fermentação de carboidratos, como maltose, glicose, manose e galactose (MERCHANT & PACKER, 1975). Não fermenta a lactose, não produz gás (MUCKLE & GYLES, 1982; SONGER et al., 1988; COSTA et al., 1998), não tem atividade proteolítica, não apresenta capacidade de hidrolisar gelatina, nem de digerir caseína, e são oxidase negativos (MERCHANT e PACKER, 1975; QUINN et al., 1994).

No que se refere à redução de nitrato, sugere-se que há dois biótipos baseados na produção de nitrato redutase, demonstrado por análise com enzimas de restrição (Batey, 1986b). A redução de nitrato a nitrito caracteriza cepas que infectam principalmente cavalos (biovar *equi*) e apresenta sensibilidade à estreptomicina, enquanto as cepas que infectam ovinos e caprinos (biovar *ovis*) são principalmente negativas para nitrato e resistentes à estreptomicina (COSTA et al., 1998); bovinos seriam infectados por ambas as cepas (SONGER et al., 1988; SUTHERLAND et al., 1996).

Devido à importância da bactéria *C. pseudotuberculosis*, vários genomas de diferentes linhagens desta espécie já foram sequenciados ou estão com o sequenciamento em andamento. A partir destes dados pode-se desenvolver ferramentas úteis para análises comparativas que auxiliarão na elucidação de mecanismos de virulência e patogenicidade (SOARES et al., 2013).



## 2.2. ASPECTOS GERAIS DA INFECÇÃO POR *Corynebacterium pseudotuberculosis*

### 2.2.1 Linfadenite caseosa

A LC é uma doença infecciosa crônica caracterizada pela formação de granulomas (WILLIAMSON, 2001). É considerada uma doença de ocorrência mundial, sendo descrita em países que possuem significativa população de caprinos e ovinos, como Austrália, Estados Unidos, Nova Zelândia e Brasil (PATON *et al.*, 2005).

Caracterizada pela necrose das glândulas linfáticas, a doença é geralmente classificada como uma doença cutânea e visceral, porém na maioria dos casos, os animais infectados apresentam as duas formas da doença (PIONTKOWSKI & SHIVVERS, 1998; SCOTT, 2007). Na forma cutânea tem-se a formação de granulomas em linfonodos superficiais, principalmente os parotídios, submandibulares, poplíteos, pré-crurais, supra-mamários e pré-escapulares, e em tecidos subcutâneos, sendo a forma clínica mais frequente, com tamanhos que variam entre 3 e 12 cm de diâmetro (KURIA *et al.*, 2001; CHIKHAOUI *et al.*, 2013), contendo uma secreção purulenta de aspecto leitoso e esbranquiçado (AL-GAABARY *et al.*, 2009). Na forma visceral há presença de granulomas nos linfonodos internos (mesentéricos e mediastínicos) e em órgãos como pulmões, baço, rins, fígado, medula e no sistema reprodutor (CHIRINO-ZÁRRAGA *et al.*, 2006; DORELLA *et al.*, 2006; VALDÍVIA *et al.*, 2013).

Quando a infecção afeta o sistema respiratório, os sinais clínicos incluem perda de peso, dispnéia, taquipnéia e tosse crônica. Podendo contribuir para perda de peso crônica com consequente subfertilidade e diminuição da produção de leite e lã. As infecções também podem ser assintomáticas, dificultando as análises epidemiológicas sobre a prevalência da doença (PATON *et al.*, 1994; ARSENAULT *et al.*, 2003).

Tendo em vista que os casos de Linfadenite Caseosa em humanos são relatados por profissionais ligados a criação dessas espécies, a LC é considerada uma zoonose ocupacional. Foram relatados, aproximadamente 25 casos de infecção em humanos com este microrganismo (MILL *et al.*, 1997; PEEL *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2005), onde a transmissão do agente para o homem pode ocorrer por contato com o material caseoso advindo dos abscessos da pele, linfonodos, e, ocasionalmente, pela ingestão do leite de animais que apresentam mastite (RIBEIRO *et al.*, 2001).

### 2.2.2 Dados epidemiológicos e econômicos

A linfadenite caseosa tem distribuição mundial e geralmente segue a distribuição dos rebanhos de ovinos e caprinos. A disseminação da doença no mundo provavelmente ocorreu através da importação de animais infectados (Baird & Fontaine, 2007). De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal, entre os 201 países que relataram suas situações sanitárias, 64 declararam a presença de animais com linfadenite caseosa dentro de suas fronteiras em 2009 (Ruiz et al., 2011). Estes países são distribuídos nas Américas (19 de 42países), África (18 de 51), Ásia (11 de 43), Europa (14 de 51) e Oceania (2 de 14) (OIE, 2009).

Contudo, um número razoável de países com problemas referentes a esta doença provavelmente ainda podem ter dados subnotificados (Guimarães *et al.*, 2011; Kumaret *al.*, 2012). Entretanto, a importância do estudo da LC para o Brasil pode ser estimada com base no aumento da ovinocaprinocultura e, conseqüentemente, pelo impacto econômico desta doença, principalmente para os pequenos produtores (Sá *et al.*, 2013). Dados do IBGE (2015) mostram que o Brasil possui aproximadamente 18 milhões de ovinos e 10 milhões de caprinos. Na região Sul do Brasil está concentrada cerca de 30% do rebanho ovino e 3,8% do caprino, localizados principalmente nos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul. Neste contexto, a atividade pecuária destes rebanhos constitui uma importante fonte de alimento e de renda no Nordeste brasileiro, onde se localiza cerca de 55% do rebanho ovino e 90% do rebanho caprino do País, com destaque para os Estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará. (GUIMARÃES *et al.*, 2011; IBGE, 2015).

No Brasil, o primeiro relatório de linfadenite caseosa foi feito por Duport em 1918 (Garcia et al., 1987). Um estudo soroepidemiológico ELISA feito no Estado de Minas Gerais encontrou valores de prevalência de 75,8% para ovinos (GUIMARÃES et al., 2009a).

A Bahia, por ser a maior produtora de caprinos e a segunda maior de ovinos do país com 33,7% e 19,1%, respectivamente, do efetivo nacional (BRASIL, 2007), é o estado nordestino mais afetado, principalmente nas regiões semiáridas, onde os animais são criados de forma extensiva na vegetação espinhosa da Caatinga, favorecendo, assim, a contaminação dos animais e a disseminação da doença.

Um estudo sorológico realizado no ano de 2003 em 19 municípios do semiárido baiano demonstrou um percentual médio de 46,66% da prevalência desta doença em caprinos. Entretanto nas três microrregiões estudadas, a do Baixo e Médio São Francisco evidenciou

uma soro-prevalência de 58,01%, a do Piemonte da Diamantina, 37,76% e na microrregião Nordeste constatou-se 31,67%. Para os autores, as variações percentuais apresentam um comportamento relativamente homogêneo, quando se considera à mesma região, e que provavelmente estas diferenças nos percentuais estejam relacionadas com o tamanho da população caprina e as densidades populacionais (MEYER, 2003).

Loreiro (2012), utilizando uma soroteca com 690 amostras ovinas, coletadas no ano de 2008, em 37 municípios estado da Bahia, com o apoio da Associação de Criadores de Caprinos e Ovinos da Bahia (ACCOBA) e da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) obteve uma prevalência aparente de 21,8% de ovinos de raça definida soropositivos para infecção por *C. pseudotuberculosis*, sendo a prevalência real, calculada segundo Noordhuizen et al. (1997), de 22,1% de soropositivos. Neste trabalho foram amostrados 690 dos 145.438 animais registrados na Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos (ARCO), sendo que esses ovinos em sua maioria eram das raças Dorper e Santa Inês e pertenciam a 54 produtores diferentes. A pequena diferença estatística entre a prevalência obtida e a real se deve ao fato do ELISA utilizado ter alta sensibilidade e especificidade, o que aproxima os dados obtidos da prevalência real, segundo Noordhuizen et al. (1997).

As perdas econômicas decorrentes dessa doença se devem à diminuição na produção de leite e ganho de peso, associadas à redução do valor das peles devido às cicatrizes, além do custo com fármacos e mão de obra necessária para o tratamento de granulomas superficiais (HOELZEET *al.*, 2013). Estes prejuízos aumentam quando os linfonodos afetados estão em áreas críticas (mandíbula, região crural, úbere), afetando a mastigação e a locomoção com o consequente efeito na produção de leite, lã e carne (Al-GAABARY *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2011).

Os prejuízos na indústria se devem à menor porcentagem de utilização das carcaças de animais afetados, danos à pele, juntamente com a necessidade de inspeção detalhada das carcaças (GUIMARÃES *et al.*, 2009b). No Nordeste brasileiro, onde ovinos são importantes fontes de alimento e renda, a situação é ainda mais crítica devido ao tipo de vegetação (espinhosa) e ao baixo nível de escolaridade dos agricultores (UNANIAN *et al.*, 1985). Também está se tornando um problema para as regiões Sudeste, Norte e Centro-Oeste, onde esta atividade cresce rapidamente, afetando negativamente a indústria de processamento de carne (GUIMARÃES *et al.*, 2009a).

### 2.2.3 Transmissão da infecção

A transmissão e disseminação do bacilo estão relacionadas com a sua resistência às condições ambientais encontradas na criação dos animais (AUGUSTINE & RENSHAW, 1986; YERUHAM *et al.*, 2004). *C. pseudotuberculosis* é resistente a temperaturas baixas e locais úmidos, podendo sobreviver por até oito meses no solo, por quatro meses em galpões de tosquia, e por dois meses em feno e materiais contaminados (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A ruptura do granuloma superficial libera grande número de bactérias viáveis na pele, e pode rapidamente contaminar o ambiente imediato (BAIRD e FONTAINE, 2007). Uma vez que as bactérias são capazes de sobreviver por extenso período de tempo (meses a anos) no ambiente, esta pode alojar-se em superfícies e continuamente infectar animais que entrem em contato com elas (PÉPIN *et al.*, 1999).

Animais infectados que não apresentam sintomas clínicos podem eliminar a bactéria através de suas vias respiratórias; mesmo sendo demonstrado que granulomas pulmonares têm um coeficiente de transmissão pequeno, eles são mais importantes para a manutenção da infecção no rebanho na fase endêmica (O'REILLY *et al.*, 2008; BASTOS *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos ressaltam que a presença de reprodutores (machos) soropositivos no rebanho; animais com abscessos superficiais, com sinais de doença respiratória, ocorrência de falhas reprodutivas e animais em péssimas condições físicas no rebanho foram responsáveis pelo aumento da soroprevalência de 13.2% para 62.5% em 6 anos, em rebanhos de caprinos leiteiros na Polônia (KABA *et al.*, 2011).

No entanto, a transmissão pode ocorrer através do contato direto ou indireto com o pus dos granulomas em animais doentes (NAIRN & ROBERTSON, 1974). Materiais que são utilizados no manejo dos animais, tais como os usados durante a identificação, a castração, marcadores auriculares, tatuadores, máquinas de tosquia, drenagem de abscessos, bem como contato com um pedaço não cauterizado do umbigo podem transmitir o agente (BRAVERMAN *et al.*, 1999).

Indiretamente, alguns vetores, tais como insetos, devem ser considerados na transmissão da doença, uma vez que *C. pseudotuberculosis* já foi isolado a partir da superfície corporal, intestinos e fezes de moscas domésticas. (COSTA *et al.*, 1998).

Constitui outro agravante, o uso de cercas de arame farpado ou calhas e estacas afiadas, com arestas cortantes, pode causar lesões na pele dos animais, abrindo passagem para a entrada de bactérias (Guimarães *et al.*, 2009a). Ressalta-se ainda, que no Nordeste brasileiro,

as bactérias podem penetrar via transcutânea ou através de feridas na pele causadas pela vegetação da caatinga da região que pode lesionar a pele de animais, aumentando a exposição à contaminação (ALVES *et al.*, 2007; BAIRD e FONTAINE, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2011).

Apesar dos ovinos e caprinos serem os animais mais comumente infectados por *C. pseudotuberculosis*, a LC pode ser considerada um problema de saúde pública emergente, pois tem a capacidade de produzir a toxina da difteria como consequência de uma lisogenização com o fago da difteria, o que levou as autoridades de muitos países a induzir seus serviços de saúde a considerar às doenças causadas por todas as espécies de *Corynebacterium*, que incluem *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, no diagnóstico diferencial desta enfermidade (MAXIMESCU *et al.*, 1974). Por muitos anos foi requerida a notificação de *C. pseudotuberculosis* toxigênica em qualquer órgão de controle nacional das doenças transmissíveis (DEWINTER *et al.*, 2005).

#### **2.2.4 Diagnóstico e tratamento**

No decorrer dos anos inúmeros testes sorológicos foram desenvolvidos na tentativa de superar o problema dos animais com casos assintomáticos da LC, incluindo o teste de soro aglutinação (AWAD, 1960), a imunodifusão em gel (BURREL, 1980; ANDERSON E NAIRN, 1984), a inibição da hemólise (BURREL, 1980a) e diferentes ensaios de ELISA, como ELISAs indiretos utilizando varias preparações da célula bacteriana, proteínas secretadas e a toxina PLD de *C. pseudotuberculosis* (DERCKSEN *et al.*, 2000; CARMINATTI *et al.*, 2003; BINNS *et al.*, 2007), ELISA sanduiche com PLD (TER LAAK *et al.*, 1992; DERCKSEN *et al.*, 2000) e ELISA para detectar interferon gama (IFN- $\gamma$ ) como um marcador de imunidade mediada por células contra *C. pseudotuberculosis* (PRESCOTT *et al.*, 2002; MENZIES *et al.*, 2004).

Contudo, a maioria destes testes não possui sensibilidade e especificidade suficientemente satisfatórias, e não permite a diferenciação entre os animais infectados e os vacinados.

O diagnóstico padrão atual, da LC baseia-se na cultura bacteriológica seguida por identificação bioquímica dos isolados, através do teste bioquímico API Coryne system (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France), o qual consiste em 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48h.

Com base na reação de PCR multiplex (mPCR), Pacheco *et al.*, (2007) utilizaram múltiplos *loci*, para amplificar simultaneamente três sequências de genes específicos a partir do material purulento presentes nos granulomas, como: 16S *rRNA*, gene de escolha no estudo de taxonomia bacteriana; *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), amplamente usado para análises filogenéticas; e PLD (fosfolipase D), que codifica uma exotoxina associada com a virulência de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* e *Arcanobacterium haemolyticum*. Esta proposta se mostrou tão específica quanto à cultura bacteriana seguida de testes bioquímicos.

O uso de antibióticos para o tratamento da doença pode ser realizado, porém não é considerado financeiramente viável para os criadores. Apesar da bactéria ser sensível a vários tipos de antibióticos *in vitro*, *in vivo* não se observa a mesma sensibilidade (OLSON *et al.*, 2002), visto que a droga não consegue ultrapassar os granulomas, o que torna a terapia ineficiente (COSTA *et al.* 2011).

O tratamento dos animais infectados ainda consiste na drenagem dos granulomas seguido pela limpeza e cauterização química, geralmente com iodo a 10%, após a remoção do linfonodo superficial afetado (NOZAKI *et al.*, 2000). Embora seja uma medida de controle importante o procedimento não é tão eficaz como se esperava devido à presença de granulomas internos (PATON *et al.*, 2003). A drenagem do abscesso deve ser feita de forma que evite a contaminação ambiental, com a desinfecção do material cirúrgico e incineração dos materiais descartáveis (GUIMARÃES *et al.*, 2011). A excisão cirúrgica dos linfonodos superficiais é uma opção muito utilizada, porém não elimina por completo as bactérias, e contribui para a disseminação e contaminação ambiental. O diagnóstico precoce da doença é essencial para a separação de animais infectados do rebanho para conter os prejuízos causados aos criadores.

Apesar de a excisão cirúrgica dos linfonodos superficiais ser uma opção muito utilizada, não elimina por completo as bactérias, e contribui para a disseminação e contaminação ambiental. Sendo assim, o diagnóstico precoce da doença é essencial para a separação de animais infectados do rebanho para conter os prejuízos causados aos criadores.

### **2.2.5 Patogenia**

No que tange à inter-relação patogenia x imunologia da LC, o patógeno ao penetrar no hospedeiro, é capturado localmente por células fagocitárias, neutrófilos e macrófagos. Assim, após a fagocitose, o fagossomo se funde ao lisossomo; contudo, a bactéria continua a se multiplicar dentro dos fagolisossomos, onde sobrevive à ação de enzimas fagolisossômicas

com ajuda da camada lipídica externa da parede celular levando à degeneração e morte celular dos macrófagos (DORELLA *et al.*, 2006; BAIRD & FONTAINE, 2007). Após penetrar no hospedeiro através das mucosas ou de feridas na pele, a bactéria dissemina-se, com tropismo pelo sistema linfático aferente, linfonodos locais e órgãos internos (BATEY, 1986a).

Esta incapacidade por parte dos macrófagos de eliminar a bactéria pode ser devida, além da presença da camada lipídica, mas também da incapacidade destes de produzir óxido nítrico. O óxido nítrico é um potente efector na eliminação de patógenos intracelulares e a inibição da produção de óxido nítrico em macrófagos pulmonares de ovinos se deve a componentes antigênicos de *C. pseudotuberculosis* (HARD, 1969; BOGDAN *et al.*, 1997).

A camada lipídica da parede desta bactéria tem a capacidade de inibir a fagocitose, aumentando a sua virulência (citotoxicidade) e a sobrevivência no interior dos macrófagos (DORELLA *et al.*, 2006). Granulomas são formados pela liberação de enzimas lisossômicas (BAIRD & FONTAINE, 2007). Além de participar da patogenicidade, o ácido micólico parece ser importante na sobrevivência dessa bactéria no ambiente (WEST *et al.*, 2002).

Lesões granulomatosas são formadas por um centro necrótico contendo pus de cor verde-amarelado, cercado por camadas concêntricas de células do sistema imune delimitadas por uma cápsula de tecido conjuntivo. A consistência do material purulento que evolui de líquido, no início da formação do granuloma, a pastoso, chegando a caseoso nas lesões antigas (PEPIN, *et al.*, 1994).

As fases da infecção por LC têm sido divididas em uma fase inicial (1-4 dias pós-infecção) caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos para o local da inoculação e linfonodos de drenagem; uma fase de amplificação (5-10 dias pós-infecção) caracterizada pelo desenvolvimento de piogranuloma, e uma fase de estabilização, caracterizada pela maturação e persistência do piogranuloma (PEPIN *et al.*, 1997).

Este patógeno é capaz de sobreviver à fagocitose, evitando sua eliminação pelas células do sistema imune, induz resposta inflamatória com formação de tecido fibroso em torno à infecção (PUGH, 2005), produz uma exotoxina (fosfolipase D) que correspondente à fração protéica de 31,5 KDa (ELLIS *et al.*, 1990; COSTA, 1998) que permite sua disseminação no interior do hospedeiro e possui em sua superfície um lipídeo tóxico, que lhe permite sobreviver no interior dos macrófagos (JONES, T.C *et al.*, 2000).

Na patogenia da doença a secreção da fosfolipase D, capaz de converter esfingomiélin em N-acetoesfingosil (ceramida), uma esfingomiélinase, aumenta localmente a permeabilidade vascular, levando à disseminação do patógeno no interior do hospedeiro (JOLLY, 1965; CARNE & ONON, 1978; HODGSON *et al.*, 1992).

### 2.3 RESPOSTA IMUNE A *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O conjunto global dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção pode ser dividido em mecanismos inatos, que preexistem nos indivíduos e atuam na fase inicial da infecção, e mecanismos induzidos ou adaptativos, que envolvem a geração de células efetoras antígeno-específicas contra o patógeno invasor e de células de memória que previnem as infecções subsequentes (JANEWAY e TRAVERS, 2014).

Na resposta imune inata, os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas no início da infecção e a presença destes tipos celulares pode ser crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e também secundária a LC (HARD, 1969; JOLLY, 1965a; LAN et al. 1999). Além disso, o predomínio inicial de macrófagos está relacionado a uma rápida resolução da infecção, enquanto que a maior presença de polimorfonucleares neutrófilos levaria, numa etapa seguinte, a uma infecção crônica (JOLLY, 1965). Entretanto, bactérias intracelulares patogênicas sendo resistentes à degradação dentro dos fagócitos, tendem a causar infecções crônicas, difíceis de serem erradicadas (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983; REINOUT *et al.*, 2002).

A fagocitose é a primeira linha de defesa e o principal mecanismo da imunidade natural (ou inata) contra bactérias intracelulares. A resistência à fagocitose e à digestão lisossomal, por sua vez, são mecanismos de escape deste tipo de agente, que podem levar à formação de lesões crônicas ou recidivantes (ABBAS *et al.*, 2015).

Os neutrófilos são células essenciais para a defesa contra a infecção primária, atuando para restringir o crescimento bacteriano ou agindo sobre as células infectadas de forma independente das atuações dos macrófagos e das células *Natural Killer* - NK (CONLAN NORTH, 1991; ROGERS & UNANUE, 1993; SJÖSTEDT *et al.*, 1994). Em camundongos onde a atuação destas células foram bloqueadas, através da utilização de anticorpos monoclonais, e infectados com a *Francisella tularensis* ou *Listeria monocytogenes*, microrganismos intracelulares facultativos, demonstram que os neutrófilos são essenciais para restringir o crescimento destas bactérias, antes que elas sejam capazes de atingir números suficientes para oprimir o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (CONLAN & NORTH, 1991; SJÖSTEDT *et al.*, 1994).

Por outro lado, os macrófagos, atuam na eliminação dos microrganismos fagocitados principalmente pela atuação do óxido nítrico (NO), gás solúvel altamente lipofílico, produzido pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS). Esta produção pode ocorrer, prioritariamente, pela ação de citocinas pró-inflamatórias, como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$



(MACHADO, 2004; MAYER, 2006, PÉPIN *et al.*, 1992). Por possuir ação citotóxica e citostática, o NO promove a destruição de microrganismos através da sua ligação direta com metais, principalmente o ferro, presente nas enzimas do seu alvo (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO 2003; JAMES, 1995; NATHAN & SHILOH, 2000). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de *Krebs*, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular, tão importantes para a sobrevivência e proliferação de microrganismos. Nas infecções, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido ( $O_2^-$ ) resulta na formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um poderoso oxidante de proteínas (BECKMAN & KOPPENOL, 1996). Apesar desta poderosa ferramenta, os macrófagos podem não conseguir destruir a *C. pseudotuberculosis*, este fato pode estar relacionada a não produção do NO quando essas células estão sob estímulo dos antígenos desse patógeno (BOGDAN *et al.*, 1997; GREEN *et al.*, 1991).

Bactérias intracelulares podem ativar células NK, diretamente ou estimulando os macrófagos a produzirem a IL-2, citocina ativadora de células NK. Estas células também produzem IFN- $\gamma$  que, por sua vez, ativam macrófagos promovendo a morte das bactérias fagocitadas. Sendo assim, as células NK promovem uma defesa primária a estes microorganismos antes do desenvolvimento da imunidade específica (KUBY, 1997).

Por sua vez, a resistência adaptativa a infecções causadas por bactérias intracelulares facultativas está relacionada a células T CD4. A população, destes linfócitos, pode ser dividida em subpopulações de células T auxiliaadoras tipo 1 (TH1) e células T auxiliaadoras do tipo 2 (TH2). Quando estimuladas, as células TH1 produzem dentre outras citocinas o interferon- gama (IFN-gama) e a interleucina 2 (IL-2), as quais promovem mecanismos efetores celulares da resposta imune, incluindo hipersensibilidade tardia, reações inflamatórias e, no camundongo, a produção de anticorpos da classe IgG2a, os quais são capazes de favorecer, direta ou indiretamente, a opsonização e toxicidade mediada por células. Diferentemente, a estimulação de células TH2 produzem IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e promovem síntese de anticorpos IgE e, em camundongos, IgG1, responsáveis pela imunidade humoral e reações alérgicas (MOSMANN *et al.*, 1986, COFFMAN, 2006). Estas subpopulações exercem um controle recíproco, uma resposta TH1 pode inibir o desenvolvimento de uma resposta TH2 (HOFSTRA *et al.*, 1998; COTTREZ *et al.*, 2000) e vice-versa (POWRIE *et al.*, 1993).

As células auxiliares T efectoras, chamadas células Th17 foram inicialmente descritas como uma população distinta das células T helper que são controladas pelo fator de transcrição ROR $\gamma$ t e desenvolvem-se independentemente dos fatores de transcrição T-bet, STAT4, GATA-3 e STAT6 que são críticos para o desenvolvimento Th1 e Th2. A citocina efectora principal de Th17 é IL-17; Outras citocinas são IL-22, IL-26 e GM-CSF (LYADOVA e PANTELEEV, 2015). As células Th17 produzem IL-17A (simplesmente referidas como IL-17), IL-17F, IL-21 e IL-22 como suas citocinas de assinatura. (TORRADO e COOPER, 2010).

Desta forma, as células Th17 produzem IL-17, IL-17F e IL-22, induzindo assim uma reação tecidual devido à ampla distribuição da IL-17 e IL-22 e também secretam IL-21 para se comunicar com as células do sistema imunológico. Os fatores de diferenciação (TGF- $\beta$  Plus IL-6 ou IL-21), o factor de crescimento e estabilização (IL-23) e o factor de crescimento + fatores de transcrição (STAT3, ROR $\gamma$ t e ROR $\alpha$ ) envolvidos no desenvolvimento das células Th17 foram apenas identificados. A participação de TGF- $\beta$  na diferenciação de células Th17 coloca a linhagem Th17 em relação estreita com CD4 +, CD25, + Foxp3. (LYADOVA e PANTELEEV, 2015). Relatos indicam que IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-27, IL-4 e IL-2 inibem a diferenciação de Th17.

A diferenciação, expansão e manutenção das células Th17 dependem de TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 e IL-23. O papel dessas citocinas na indução e manutenção / estabilização de células Th17 é diferente em algumas espécies, em particular em camundongos e humanos [53, 58-63]. Em geral, a diferenciação de células Th17 de camundongos depende de IL-6 e TGF- $\beta$ . IL-23, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  mantêm e amplificam as células Th17.

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

Há relatos de que IFN-gama estimula várias quimiocinas, sendo possível que essas reduzam a vascularização levando a hipóxia do granuloma gerando a necrose caseosa (EHLERS, 2001). Segundo Wynn (2004) o desenvolvimento de uma potente resposta Th1 com a produção principalmente de IFN- $\gamma$  diminui e/ou impede a formação do tecido fibroso (granuloma), mostrando que esta citocina possui uma forte atividade antifibrótica.

Sobretudo na regulação da resposta imune, a interleucina-10 (IL-10) constitui um importante elemento, originalmente descrita como uma citocina produzida por células Th2 e mediadora de efeitos anti-inflamatórios, primariamente atua em células fagocíticas e em células apresentadoras de antígenos, inibindo a transcrição e a produção de citocinas pró inflamatórias, tais como TNF-alfa e IL-12, como também a inibição da expressão do MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias, bem como a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, diminuindo a resposta sistêmica (FIORENTINO, *et. al.*, 1989; MOORE *et. al.*, 2001; OSWALD *et. al.*, 1992).

Por outro lado, a IL-10 interage com as citocinas do perfil Th1 como IFN- $\gamma$ , atuando também na regulação da formação de fibrose, importante para a formação do granuloma, mediada por citocinas do perfil Th2 como IL-4, que pode ativar um tipo de macrófago que estaria basicamente envolvido no reparo tecidual, estimulando fibroblastos e promovendo deposição de matriz extracelular que atuaria na formação do granuloma (MOSSER & EDWARDS, 2008; WYNN, 2004).

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

Pépin e colaboradores (1994a) observaram que os linfócitos T CD8+, estão mais presentes nos granulomas no sítio de inoculação do que nos linfonodos drenantes. Esta subpopulação de linfócitos estaria relacionada com a atividade efetora e citotóxica, podendo atuar como um mecanismo de proteção antibacteriana para conter a disseminação de macrófagos infectados por *C. pseudotuberculosis*. A função destas células estaria baseada na capacidade de produzir IFN- $\gamma$  e promover a lise de células infectadas (CARMINATI, 2005; LAN *et al.*, 1998).

Por vezes a ativação excessiva de macrófagos demanda uma desativação para evitar a destruição tecidual ou efeitos sistêmicos causados por citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 (MURRAY, 1999). Para controlar a inflamação excessiva e dano tecidual, citocinas imunossupressoras, como a IL-10 e o TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$* ) ambas produzidas por macrófagos no foco da infecção, e contribuem regulando negativamente a resposta imune, limitando assim a extensão do dano tecidual, gerado pela inflamação (DUARTE, 2000).

Estudos em caprinos, em ovinos e em murinos revelam que durante a infecção por *C. pseudotuberculosis* há uma forte resposta imune humoral. Entretanto é consenso que a resposta humoral isoladamente não é capaz de eliminar a infecção, embora seja extremamente importante quando associada à resposta celular (MUCKLE *et al.*, 1992).

Segundo Machado *et al* (2004) esses anticorpos não interferem com a multiplicação do organismo, mas são capazes de impedir a disseminação da infecção do local de inoculação para órgãos internos. Adicionalmente, em associação com o complemento, os anticorpos podem lisar bactérias e funcionar como opsoninas, facilitando a fagocitose. Sabe-se, entretanto, que para proteção efetiva o desenvolvimento de uma resposta celular duradoura é fundamental (SIMMONS *et al.*, 1997).

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*, 20008; D'FONSECA *et al*, 2008; ZAKY, 1976).

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).

Para Nandan *et al* (2000) a interferência da sinalização intracelular é fundamental para a estratégia de virulência de patógenos intracelulares. Análises de sinalização das MAPKs (Proteínas-quinase ativadas por mitógeno) durante infecção por bactérias intracelulares sugerem que a habilidade para regular negativamente essas vias é um importante atributo de virulência destes patógenos para persistir intracelularmente (HASAN, 2003).

## **2.4 PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA**

As bactérias patogênicas possuem genes, denominados fatores de virulência, que codificam antígenos que permitem sua entrada e sobrevivência no hospedeiro e lhes conferem características patogênicas (SCHUMAN, 2007).

A caracterização dos fatores de virulência expressos em resposta a certos estímulos é necessária para a compreensão da patogênese de espécies bacterianas (WOOLDRIDGE, 2009).

Apesar dos fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis* ainda não estarem totalmente elucidados, vários estudos estão sendo realizados com o intuito de compreender esses mecanismos e têm mostrado a existência de fatores de virulência diretamente relacionados à patogenia da LC (Alves *et al.*, 2007). Dentre os fatores já identificados estão a fosfolipase D (PLD), uma proteína integral de membrana (Fag A), um transportador de ferro-enterobactina (Fag B), uma ATP-proteína de ligação da membrana (Fag C), uma proteína de ligação a sideróforos (Fag D) e a CP40 (serina protease corinebacteriana).

#### **2.4.1 Fosfolipase D (PLD)**

O maior fator de virulência identificado é uma exotoxina, a fosfolipase D (PLD), que é encontrada no citoplasma e em menor quantidade na parede celular bacteriana (CARNE, 1940; MCNAMARA *et al.*, 1994). A fosfolipase D é uma proteína de 31 KDa (JOLLY, 1965a). Trata-se de uma fosfatidilcolina fosfatidohidrolase que age dissociando a esfingomielina, um importante componente estrutural de membrana, em colina e ceramida fosfato (HODGSON *et al.*, 1999). A degradação da esfingomielina em ceramida resulta em desorganização da membrana suficiente para causar lise celular (BROWN e OLANDER, 1987). Essa ação da PLD compromete as células do endotélio vascular, aumentando a permeabilidade vascular, favorecendo assim a disseminação do patógeno a partir do local inicial da infecção (YOZWIAK e SONGER, 1993). Desta forma, ela funciona como um fator de permeabilidade, promovendo a disseminação do patógeno para todos os tecidos do corpo do hospedeiro ao hidrolisar as ligações ésteres da esfingomielina de membranas celulares dos mamíferos. Além disso, esta exotoxina é considerada citotóxica para os leucócitos do sangue, pois promove a destruição de macrófagos caprinos durante a infecção experimental. (DORELLA *et al.*, 2009; SÁ *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Parede celular lipídica**

Localizada na face externa da parede, a camada lipídica constitui outro fator de virulência. Este conteúdo lipídico permite o organismo resistir à digestão por enzimas

celulares e assim persistir como um parasita intracelular facultativo (BRAITHWAITE *et al.*, 1993). Esses lipídios podem também ter ação letal sobre os macrófagos por ação tóxica direta sobre estas células (MUCKLE e GYLES 1983).

#### 2.4.3 Proteínas secretadas pelos genes *Fags A,B,C,D*

Outros importantes fatores de virulência desta bactéria são os genes FagA (proteína integral de membrana), FagB (transportador de enterobactinade ferro), FagC (ATP- proteína de ligação da membrana) e FagD (sideróforos), relacionados à regulação e absorção de ferro pela *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON *et al.*, 2002). Embora raramente expressos *in vitro*, quando expressos *in vivo*, aumentam a virulência bacteriana, o que indica que fatores advindos do hospedeiro podem ser responsáveis para a sua expressão (SÁ *et al.*, 2013).

#### 2.4.4 CP40

O antígeno CP40 foi identificado como um antígeno protetor de *C. pseudotuberculosis* que contribui para a virulência do parasita devido a sua atividade proteolítica (WALKER *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 1995; D'AFONSECA *et al.*, 2008). Tem sido considerado como uma serina protease, embora trabalhos mais recentes venham caracterizando-o como uma endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (SHADNEZHAD *et al.*, 2016). Em um trabalho de Walker *et al.* (1994) a vacinação de ovinos com 100ug deste antígeno na forma nativa semi-purificada resultou na redução de 82% no número de ovelhas infectadas e na redução de 98% das lesões do pulmão, o que sugeriu que este antígeno de 40 kDa desempenha um papel importante na imunidade da LC.

A CP40 foi utilizada em formulação vacinal com a cepa mutante CP09 em camundongos infectados, onde induziu resposta imune humoral quando testada individualmente ou em associação com a cepa mutante CP09, mostando potencial para uma formulação vacinal contra LC (SILVA, 2014).

#### 2.4.5 Novos alvos antigênicos

As proteínas bacterianas secretadas e de membrana representam os principais componentes da interação do patógeno com o hospedeiro. Por esse motivo, diversos estudos são conduzidos com o objetivo de identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de

vacinas e testes de diagnóstico. De acordo com Pacheco *et al.* (2011), isto fundamentou a implementação de uma abordagem combinada para caracterizar o exoproteoma de *C. pseudotuberculosis*, permitindo a identificação de 93 diferentes proteínas extracelulares, além de 11 proteínas relacionadas a diversas funções biológicas, tais como envelope celular, metabolismo respiratório e proteólise (SILVA *et al.*, 2013).

O sequenciamento de diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* fornecem dados genômicos do microrganismo Cpl19 (Silva *et al.*, 2011), Cp1002 (Pinto *et al.* 2012), Cp258 (Soares *et al.*, 2012), Cp3 99-5 (Pethick *et al.* 2012), que usados através de análises *in silico* permitem selecionar sequências para vários estudos.

Um factor de virulência crucial para a sobrevivência intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* é a proteína quinase G (PknG), uma proteína eucariótica do tipo serina-treonina quinase expressa por micobactérias patogênicas o que bloqueia a degradação intracelular de micobactérias dentro dos lisossomos (SANTHI e AISHWARYA, 2011).

O PknG de *M. tuberculosis* é uma proteína quinase de Ser / Thr que regula processos metabólicos chave dentro da célula bacteriana bem como vias de sinalização da célula hospedeira infectada. Esta proteína multidomínio tem um domínio de cinase canónica conservado com regiões flanqueadoras N- e C-terminais de funções funcionais pouco claras (GIL *et al.*, 2013).

Como parte de importantes mecanismos de sinalização celular, proteína quinases serina / treonina eucarióticas encontradas em bactérias são uma classe de moléculas que também merece atenção porque fazem parte do caminho de sinalização complexa e desempenham uma diversidade de papéis fisiológicos em processos de desenvolvimento, metabolismo secundário, divisão celular, síntese da parede celular, processos essenciais, metabolismo e virulência (PEREIRA *et al.*, 2011; FORRELLAD *et al.*, 2013).

A PknG ganhou interesse particular porque afeta o tráfego intracelular de *M. tuberculosis* em macrófagos. A maioria dos patógenos e micobactérias encontram-se rapidamente nos lisossomos, onde são mortas. Em contraste, *M. tuberculosis* permanece dentro de fagossomos; a bactéria libera PknG para bloquear a fusão fagossoma-lisossoma. As bactérias que não possuem o gene *pknG* são rapidamente transferidas para lisossomos e eliminados (WALBURGER *et al.*, 2004; WARNER e MIZRAHI 2007).

O genoma de *C. pseudotuberculosis* FRC41 tem um gene codificação para uma proteína PknG com aproximadamente 83 kDa (TROSTE *et al.*, 2010), mas sua função na bactéria ainda precisa ser investigado. Portanto, em *C. pseudotuberculosis* proteínas como

SpaC, NanH, SodC, e PknG podem desempenhar papéis importantes na virulência e patogenicidade (SANTANA-JORGE *et al.*, 2016).

## 2.5 VACINAS COMO FERRAMENTA NO CONTROLE DA LC

De certo, as vacinas propiciam uma proteção a infecções ao estimular o desenvolvimento de células direcionadas à destruição de um patógeno específico (HANDMAN, 2001; SANTOS *et al.*, 1999). Assim, a busca por uma vacina eficaz para a LC é factível, baseado na observação de que animais infectados com *C. pseudotuberculosis* podem apresentar uma proteção frente a uma exposição subsequente.

Entretanto, esta infecção primária faz com que os animais permaneçam com a bactéria (BRAGA, 2007; PÉPIN *et al.*, 1992) e possam, em situações adversas, reativar a infecção. Uma vacina, para atuar como método profilático ideal para a LC, deve ser seguro, induzir resposta imune protetora e ter o potencial de gerar memória imunológica (LIMA, 2009), ter baixo custo de produção, ser biologicamente estável e de fácil administração, além de acarretar pouco ou nenhum efeito colateral (MONTGOMERY *et al.*, 1997). Ademais, é importante que se possa identificar/diferenciar os animais vacinados dos infectados. De acordo com o tipo de material usado para indução de resposta imune, as vacinas podem ser classificadas em três gerações (ABATH *et al.*, 1998; GRIFFIN, 2002).

Vacinas são administradas em um grande número de animais supostamente sadios com o intuito de se conferir proteção contra doenças, assim, elas devem ser seguras para os animais, além de conferir adequada resposta imunológica. Várias pesquisas vêm sendo conduzidas na tentativa de se desenvolver uma vacina efetiva no controle da LC (DORELLA *et al.*, 2009).

À medida que apresenta melhor custo-benefício contra a LC é a imunização, porém ainda não existe uma vacina eficiente e protetora contra *C. pseudotuberculosis*. Assim, a busca por uma vacina ideal contra a LC, que forneça uma proteção de longa duração, sem provocar reações adversas tem sido uma prioridade (DORELLA *et al.*, 2009). Para isso, diferentes estratégias vacinais têm sido testadas, como o uso de bactérias atenuadas e mortas (BRODGEN *et al.*, 1990; SIMMONS *et al.*, 1998), sobrenadantes da cultura bacteriana (EGGLETON *et al.*, 1991; ELLIS *et al.*, 1991), frações contendo antígenos da parede bacteriana (BRAGA, 2007), proteínas recombinantes (FONTAINE *et al.*, 2006; HODGSON *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 2000; TACHEDJIAN *et al.*, 1995), vacinas de DNA (CHAPLIN



*et al.*, 1999) e uma mistura de componentes celulares e sobrenadantes (BRAGA, 2007; EL-ENBAAWY *et al.*, 2005).

Dentre os conteúdos antigênicos, existem formulações de bactérias atenuadas, mortas, frações contendo antígenos da parede bacteriana, do sobrenadante de cultura bacteriana e uma mistura de componentes celulares e sobrenadantes (BASTOS *et al.*, 2012; DORELLA, *et al.* 2009). Entretanto, convém salientar que a maioria das vacinas licenciadas para fins comerciais é conjugada a outros patógenos, tais como *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi* e *Clostridium chavoiei*. Nestas vacinas, a exotoxina fosfolipase D se encontra inativada, na forma de toxóide (PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998).

- Vacinas de primeira geração

As vacinas de primeira geração são constituídas por parasitos mortos ou vivos atenuados. A principal motivação para a utilização deste material esta na possibilidade de promover a proteção utilizando o microrganismo inteiro, entretanto sem a possibilidade de desenvolver a doença. A utilização de microrganismos mortos na busca de uma vacina para a LC vem sendo avaliada por muitos pesquisadores, encontrando níveis de proteção diferentes, entretanto os resultados apresentam uma proteção sempre parcial, não evitando o surgimento da doença e sim que esta aconteça de forma mais branda (BROGDEN *et. al.*, 1990; BROGDEN *et al.*, 1996; CAMERON *et. al.* 1972; LEAMASTER *et. al.*, 1987; RIBEIRO *et.al.*, 1988).

Ao empregar uma vacina utilizando o microrganismo vivo pode promover, de forma mais eficiente, o envolvimento tanto de uma resposta imune humoral quanto celular, além de não necessitar de doses de reforço (ABATH *et al.*, 1998; GRIFFIN, 2002). Desta forma algumas tentativas para a utilização de *C. pseudotuberculosis* viva, atenuadas naturalmente, estão sendo avaliadas, entretanto também apresentando resultados onde a proteção é parcial (BRAGA *et., al.*, 2007; MOURA-COSTA *et. al.*, 2008; RIBEIRO *et. al.*, 1991; SIMMONS *et., al.*, 1998). Na Bahia, a EBDA - Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola transferiu para uma empresa privada a comercialização de uma vacina viva atenuada produzida a partir da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, esta linhagem foi isolada em 1971 apresentando naturalmente uma baixa virulência. Apesar de promover a produção de anticorpos específicos para *C. pseudotuberculosis* (MEYER *et. al.*, 2002), esta vacina não vem apresentando o mesmo sucesso em testes de campo, sendo bastante variável o nível de proteção obtida.

O Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia vêm avaliando o potencial de uma linhagem, denominada

T1, desta bactéria como candidata a uma vacina viva atenuada por sucessivas passagens em meio de cultura específico, até o momento, níveis de proteção diferentes estão sendo alcançados (LIMA, 2009; MOURA-COSTA et al., 2007; SILVA, 2010; VALE, 2005) e desta forma mais estudos precisam ser realizados.

- Vacinas de segunda geração

As vacinas de segunda geração são compostas por microrganismos vivos geneticamente modificados, como a protozoários, bactérias e vírus; frações de antígenos de microrganismos; antígenos sintéticos e recombinantes ou antígenos não protéicos (ABATH et al., 1998; GRIFFIN, 2002). Desta forma, diversas combinações estão em estudos para na tentativa de encontrar uma formulação que seja efetiva no controle da LC, entre elas podem se observar trabalhos utilizando frações contendo antígenos da parede bacteriana (BRAGA, 2007; KUTSCHKE et al., 2000), sobrenadantes da cultura bacteriana (EGGLETON et al., 1991; ELLIS et al., 1991; MEDRANO et al., 2003), proteínas recombinantes (FONTAINE et al., 2006; HODGSON et al., 1999; IBRAHIM et al., 2007; MOORE et al., 2000; PINHO et al., 2009; SELIM et al., 2010; TACHEDJIAN et al., 1995), uma mistura de componentes celulares e sobrenadantes (BRAGA, 2007; EL-ENBAAWY et al., 2005) e bactérias geneticamente modificadas (CAMERON et al., 1997; HODGSON et al., 1994, HODGSON et al., 1992; TAUCH et al., 2005). Essas preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais, contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis.

- Vacinas de terceira geração

As vacinas de terceira geração são compostas por DNA. Na maioria das vezes, utiliza-se como candidatos à vacina plasmídeos codificando proteína(s) imunogênica(s) ou epitopos antigênicos. Algumas das vantagens do emprego de plasmídeo são as facilidades de: a) produção em larga escala, b) a caracterização molecular, c) estabilidade à temperatura ambiente, d) custos relativamente baixo e e) indução de memória imunológica prolongada (GURUNATHAN, 2000). Para a LC, a vacina de DNA contendo o material genético responsável pela construção da fosfolipase D, um potente fator de virulência desta bactéria, foi testada em ovinos e caprinos, demonstrando uma proteção em torno de 70% dos animais, sendo a melhor via de administração a intramuscular (CHAPLIN et al., 1999; De ROSE et al., 2002).

### 2.5.1 Avaliação de eficácia

De modo geral, a proteção em ovinos e caprinos com subsequente desafio com *C. pseudotuberculosis* é caracterizada pela diminuição do número de formação de lesões, diminuição do número e tamanho dos abscessos em órgãos viscerais, principalmente nos pulmões (PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998; STANFORD *et al.*, 1998).

Atualmente, não existe uma vacina capaz de conferir proteção total contra a doença. As vacinas experimentais e comerciais, tanto nacionais quanto internacionais, apresentam aspectos relevantes a serem considerados quanto à possibilidade de sua utilização. A ineficácia do processo de imunização vem sendo suprida com pesquisas que visam elucidar a complexidade da resposta imune humoral e celular contra a infecção por *C. pseudotuberculosis* nos hospedeiros-alvo, bem como a procura por melhores antígenos e com características imunodominantes e protetoras.

As vacinas utilizadas apresentam aspectos negativos que devem ser considerados quanto à possibilidade de sua utilização. Como exemplo, nem todas as vacinas licenciadas para caprinos têm a mesma eficiência para ovinos. Por não se adequarem a todos os casos, normalmente é necessário ajustar o programa de vacinação a cada caso (WILLIAMSON, 2001). A ineficácia do processo de imunização pode ainda ser associada ao uso incorreto das vacinas pelos criadores. Além disso, o estudo da disseminação da bactéria pelo plantel demonstrou que animais aparentemente sem abscessos supurados também são transmissores, provavelmente por transmissão por via aerógena (PATON *et al.*, 2003).

Os resultados até então obtidos demonstram a necessidade de desenvolver uma vacina que ofereça proteção eficiente, com a diminuição acentuada dos efeitos colaterais. Além disso, vacinas mais eficientes contra *C. pseudotuberculosis* seriam aquelas que fornecessem uma proteção esterilizante, ao invés de uma neutralizante. Portanto, ainda não existe até agora uma vacina capaz de conferir proteção total contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

## 2.6 PROTEÍNAS KINASES ATIVADAS (MAPKS): MODULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO

Interações iniciais entre macrófagos e bactérias patogênicas resultam na ativação de vias de sinalização intracelulares, por meio de que os eventos mediados por receptores estão associados com respostas transcricionais e tradução de proteínas (SOUZA, *et al.*, 2007).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) são uma subfamília de proteínas quinases serina /treonina específica, que regulam uma variedade de funções

celulares e convertem estímulos extracelulares em diversas respostas celulares. MAPKs estão entre as mais antigas vias de transdução de sinais e são amplamente usadas ao longo da evolução em muitos processos fisiológicos (WIDMANN, *et al*, 1999; CARGNELLO e ROUX, 2011).

Estas são expressas por todos os tipos de células e respondem aos estímulos (mitógenos) extracelulares, que medeiam a transdução de sinal a partir de receptores de superfície celular para o núcleo (NAMUZAWA, *et al*, 2003; SON, *et al*, 2011). As MAPKs, partem de um sistema de fosforilação em que três cinases são sequencialmente ativadas (BOUTROS, *et al*, 2008; JOHNSON, *et al*, 2002), sendo expressas em células de mamíferos e traduzem sinais em resposta aos fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e condições de estresse. Apesar de sua presença onipresente, sendo expressos em todos os receptores de células eucarióticas, elas regulam respostas biológicas que diferem entre contextos celulares.

As MAPKs convencionais compreendem quinases 1/2 (ERK1 / 2) que regulam os sinais extracelulares, quinases c-Jun amino terminal (N) - 1/2/3 (JNK1 / 2/3), isoformas p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e ERK5 (CHEN, *et al*, 2001; PEARSON, *et al*, 2001; KYRIAKIS e AVRUCH, 2001). MAPKs atípicas têm particularidades não conformes e compreendem ERK3 / 4, ERK7 e quinase tipo Nemo (NLK) (COULOMBE e MELOCHE, 2007). Dentre estes, os grupos mais estudados de MAPKs em mamíferos são as isoformas ERK1 / 2, JNKs e p38, mas recentes estudos têm lançado alguma luz sobre a regulação e a função outros grupos de MAPKs.

Três subfamílias de MAPKs foram bem caracterizadas: MAPK p38, que contém quatro iso-formas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ ); ERK, a quinase regulada por sinalização extracelular, com isoformas da p44 (ERK1) e p42 (ERK2); e a proteína cinase N-terminal c-jun, com isoformas, JNK 1, JNK 2 e JNK 3 (BROWN, *et al*, 2009; ONO, *et al*, 2000).

Tabela 1. Componentes das vias MAPK em células de mamíferos.

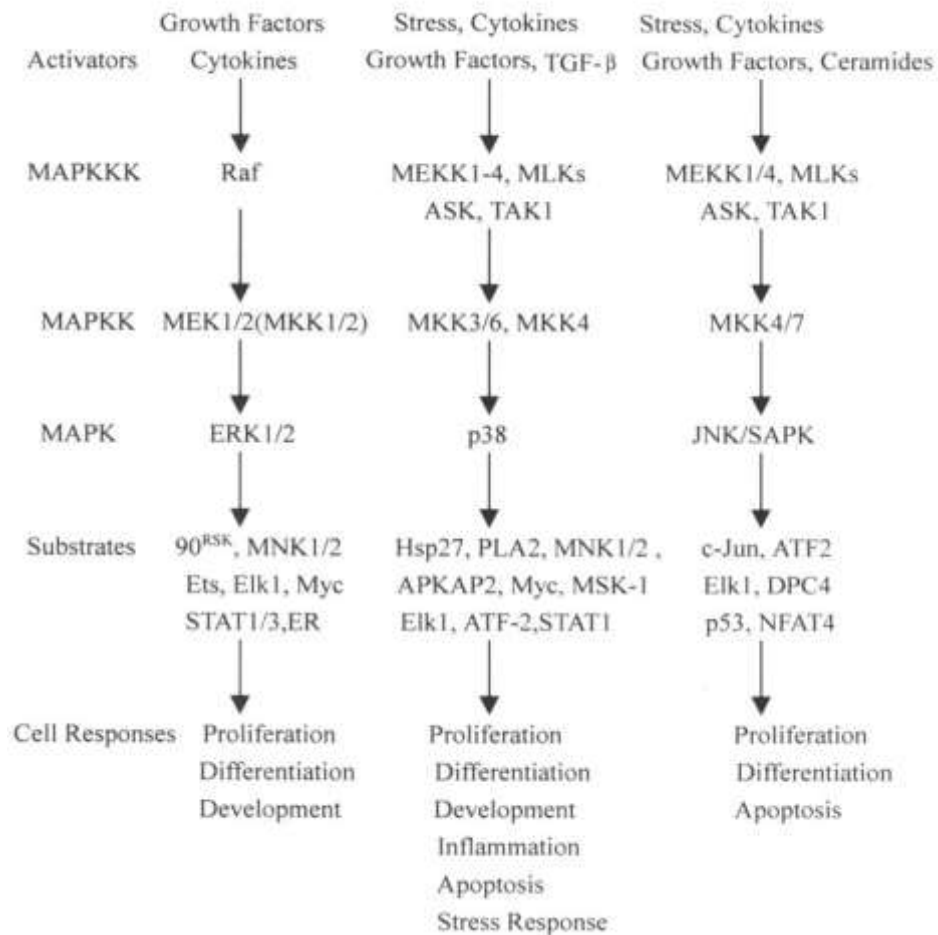
MAPKKK	MAPKK	MAPK
Raf-1, A-Raf, B-Raf, Mos,	MEK1(MKK1), MEK2(MKK2),	ERK1, ERK2, p38a, p38b,
TAK1, MUK, SPRK, MST,	MEK5, MKK3, MKK4, MKK6,	p38g, p38 d, JNK1, JNK2,
MEKK1, MEKK2, MEKK3,	MKK7	JNK3, ERK3, ERK4, ERK5
MEKK4, Tpl-2, ASK		

Fonte: ZHANG & LIU (2002).

Estas MAPKs podem ser ativadas por uma variedade de diferentes estímulos, mas em geral, ERK1 e ERK2 são preferencialmente ativados em resposta a fatores de crescimento e ésteres, as quinases JNK e p38 são mais sensíveis aos estímulos de estresse variando de choque osmótico e radiação ionizante e ao estímulo de citocinas (HAYASHI & LEE, 2004). Apesar de cada MAPK ter características únicas, uma série de características são partilhadas pelas vias MAPK estudadas até então (ROUX, *et al.*, 2004; CARGNELLO e ROUX, 2011).

As variadas funções das MAPKs são mediadas através da fosforilação de vários substratos, incluindo fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. As MAPKs também catalisam a fosforilação e ativação de várias proteínas quinases, denominadas proteínas quinases MAPK-ativadas (MKs), que representam um passo enzimático e de amplificação adicional nas cascatas catalíticas da MAPK. As MKs são quinases relacionadas que medeiam várias funções biológicas em resposta a mitógenos e estímulos de estresse. Devido à falta de inibidores específicos contra estas quinases, tem sido um desafio estabelecer as suas funções biológicas e diferenciar as funções das MAPKs.

A MAPK p38 regula a expressão de diversas citocinas, é ativada nas células do sistema imune por citocinas inflamatórias, e desempenham um papel importante na ativação da resposta imunológica do hospedeiro (KIM, *et al.*, 2008). ERK 1 e 2 são amplamente expressas e envolvidas na regulação da meiose, mitose e funções pós-mitóticas em uma variedade de células. As citocinas estão entre os muitos estímulos diferentes capazes de ativar as vias de ERK 1 e ERK 2 (NISHIMOTO *et al.*, 2006; MELOCHE *et al.*, 2007). Adicionalmente, partes da MAPK p38 cerca de 50% de homologia com ERK (PEARSON *et al.*, 2001) , sugerindo que estas duas vias podem desempenhar papéis semelhantes durante a resposta imune do hospedeiro.

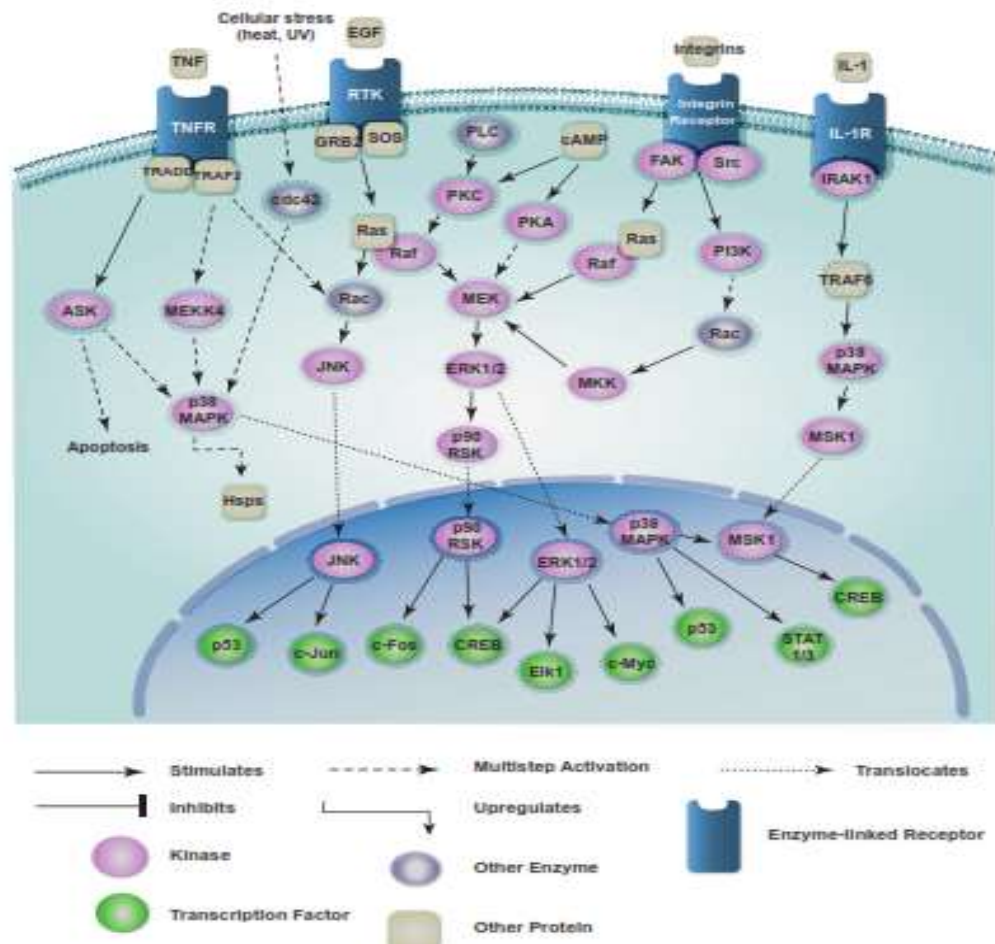


**Figura 1:** Principais cascatas de MAPK em células de mamíferos.

**Fonte:** Adaptado de ZHANG, W. & LIU, H. T., "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells". Cell Res, 2002.

Desta forma, as MAPKs regulam muitos processos fisiológicos em resposta a diversos estímulos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, antígenos, toxinas, drogas, perfil celular, adesão à matriz extracelular, e interações celulares. Esta ativação de MAPKs em resposta a estes diferentes estímulos contribui para o controle da transcrição, proliferação, desenvolvimento, morte celular, motilidade e muitas outras importantes respostas regulatórias nas células. Entretanto, para controlar tais respostas biológicas, as MAPKs são ativadas e inativadas com precisão espacial e temporal dentro da célula. A perda desse controle espaciotemporal de sinalização MAPK por mutação ou expressão alterada de proteínas que regulam as MAPKs podem levar a doenças incluindo câncer, neurodegeneração, inflamação e falhas no desenvolvimento. Assim, a definição da natureza dinâmica das interações de MAPKs é extremamente importante para a compreensão dos mecanismos regulatórios e de como a desregulação de interações das MAPKs contribui para doenças (JOHNSON, 2011).

Segundo Nandan *et al.* (2000) a interferência da sinalização intracelular é fundamental para a estratégia de virulência de patógenos intracelulares. Análises de sinalização das MAPKs durante infecção por bactérias intracelulares sugerem que a habilidade para regular negativamente essas vias é um importante atributo de virulência destes patógenos para persistir intracelularmente (HASAN, 2003; SOUZA *et al.*, 2014.).



**Figura 2:** Esquema descritivo da cascata de sinalização MAPK. A via de proteína quinase ativada por mitógenos evoca uma cascata de sinalização intracelular em resposta a estímulos extracelulares, como calor e estresse. Pode influenciar a divisão celular, metabolismo e sobrevivência.

**Fonte:** Adaptado de TOCRIS – BIOSCIENCE (2011).

### 3.0 OBJETIVOS:

#### 3.1 Objetivo Geral:

Avaliar aspectos da resposta imune celular e humoral de camundongos *Swiss* infectados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, ER1409, sob estímulos de antígenos recombinantes rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582(G04), rCP7041(G10) desta bactéria.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar *in vitro* o papel das vias MAPK p38, ERK 1 / 2 e JNK 1/2/3 na produção de óxido nítrico em células esplênicas de camundongos infectados com cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, sob estímulo de antígenos recombinantes.
- Avaliar *in vitro* a expressão dos marcadores CD3/CD4, CD3/CD8 e FOXP3 em células esplênicas de camundongos infectados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*, sob estímulo de antígenos recombinantes.
- Avaliar a produção de imunoglobulina da classe IgG e as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de camundongos infectados com a linhagem selvagem, ER1409, de *C. pseudotuberculosis*.



#### 4.0 DELINEAMENTO DA TESE

Para analisar a resposta imune de camundongos infectados com a linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis*, ER1409, avaliou-se a produção de anticorpos, o papel das vias MAPK na resposta *in vitro* de células esplênicas estimuladas com antígenos recombinantes. Para tanto, o presente trabalho foi subdividido em três manuscritos de acordo com os assuntos a serem abordados, como se segue:

##### **Manuscrito 01:**

Potenciais Fatores de Virulência e Alvos Antigênicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

##### **Manuscrito 02:**

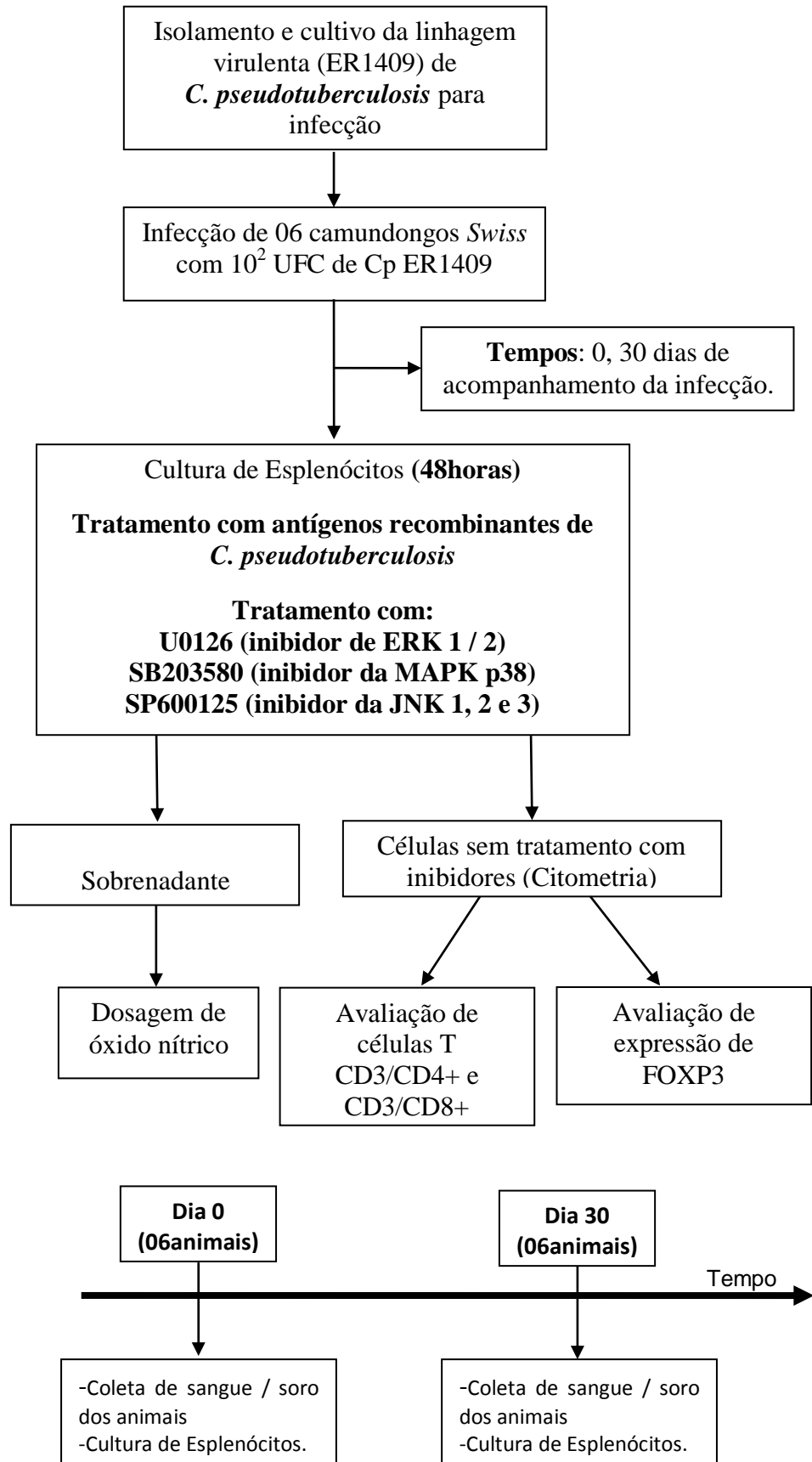
Avaliação do papel das vias ERK 1 / 2, MAPK p38 e JNK 1, 2 e 3 na Produção de Óxido Nítrico em Esplenócitos de Camundongos Infectados sob Estímulo de Antígenos Recombinantes de *C. pseudotuberculosis*.

##### **Manuscrito 03:**

Avaliação da produção de Imunoglobulina G, suas Subclasses e da Expressão dos Marcadores CD3/CD4+, CD3/CD8+ e FOXP3 em Células Esplênicas Camundongos Infectados com a linhagem selvagem ER1409 de *C. pseudotuberculosis*, Estimulados com Antígenos Recombinantes desta Bactéria.

Estes experimentos serão apresentados em forma de artigos científicos. Para manter a fluidez da leitura, as referências bibliográficas de cada manuscrito estarão agrupadas no final desta tese.

## 5.0 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



**ARTIGO 01 (Revisão)****Potenciais Fatores de Virulência e Alvos Antigênicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis***

SANTOS<sup>1</sup>, Heidiane Alves; COSTA-SILVA, Marcos; BRITO, Ioná; SALES, Tatiane Santana; SOUZA, Andréia Pacheco; PEDRAL, Geraldo; TRINDADE, Soraya Castro; VALE, Vera Lucia Costa; MEYER, Roberto.

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia : Departamento de Biointeração - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências de Saúde, Av.Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

**RESUMO**

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, um patógeno bacteriano intracelular facultativo, é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), uma doença infecciosa que afeta ovinos e caprinos sendo responsável por perdas econômicas significativas nestas criações. Esta doença é caracterizada principalmente por necrose caseosa induzida pelas bactérias nos ganglios linfáticos. Neste sentido, o controle e gerenciamento da LC se fazem necessário. Assim, alguns fatores de virulência são apontados como potenciais alvos para o desenvolvimento de estudos de patogenicidade e de testes diagnósticos e de vacinas. Neste trabalho destacamos algumas das proteínas promissoras neste sentido: CP40, PknG SpaC, SodC e NanH de *C. pseudotuberculosis*.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, virulência, alvos antigênicos.

## INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma importante enfermidade que afeta ovinos e caprinos, podendo ocasionalmente acometer outras espécies de animais, inclusive humanos o que a torna uma potencial zoonose (MOURA-COSTA *et. al.*, 2008). A LC possui prevalência elevada em muitas partes do mundo e causa perdas econômicas significativas, sendo que a disseminação deste microrganismo no animal hospedeiro ocorre a partir dos sítios linfáticos para os sítios secundários, como os linfonodos regionais e órgãos internos como o pulmão, onde se desenvolvem granulomas secundários (KURIA *et al.*, 2001; SOARES, VIANA & LEMOS, 2007).

*C. pseudotuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa que se multiplica dentro dos macrófagos e sobrevive à ação de enzimas fagolisossômicas com ajuda da camada lipídica externada parede celular (DORELLA *et. al.*, 2006; BAIRD & FONTAINE, 2007). Após penetrar no hospedeiro através das mucosas ou deferidas na pele, a bactéria dissemina-se, com tropismo pelo sistema linfático aferente, linfonodos locais e órgãos internos. Este processo depende da capacidade do agente para infectar os macrófagos, resistir a fagolisossomos e matar as células, liberando novas bactérias e causando necrose (BATEY, 1986a).

A camada lipídica da parede desta bactéria tem a capacidade de inibir a fagocitose, aumentando a sua virulência (citotoxicidade) e a sobrevivência no interior dos macrófagos (DORELLA *et. al.*, 2006). Granulomas são formados pela liberação de enzimas lisossômicas (BAIRD & FONTAINE, 2007). Além de participar da patogenicidade, o ácido micólico parece ser importante na sobrevivência dessa bactéria no ambiente (WEST *et al.*, 2002).

Acredita-se que a bactéria utiliza a exotoxina hemolítica fosfolipase D (PLD) para disseminar a infecção no hospedeiro. O período de incubação para a formação destes granulomas varia de dois a seis meses (ANDRADE *et. al.*, 2012; BILLINGTON *et. al.*, 2002; SMITH e SHERMAN, 2009). Todavia, o estabelecimento da doença no animal é considerado um processo lento que pode durar meses, resultando assim, em uma doença de caráter crônico (ECKERSALL *et. al.*, 2007).

Para que ocorra a instalação e a manifestação clínica da doença é necessário o crescimento bacteriano no interior do hospedeiro (SEYFFERT *et al.*, 2010), no qual o patógeno atuará com a expressão conjunta de genes responsáveis pelos fatores de virulência, em resposta ao ambiente apropriado (WOOLDRIDGE, 2009).

A dinâmica da resposta imunológica à infecção só pode ser compreendida se houver a caracterização das proteínas bacterianas responsáveis pela indução da resposta imune do hospedeiro (SEYFFERT *et. al.*, 2010). A razão do sucesso da imunização com algumas vacinas comerciais depende, principalmente, da natureza do antígeno, e é sabido que algumas proteínas conhecidas do *C. pseudotuberculosis* estão ligadas a seus fatores de virulência.

Considerando-se que a caracterização dos fatores de virulência expressos em resposta a certos estímulos é necessária para a compreensão da patogênese de espécies bacterianas (WOOLDRIDGE, 2009), este estudo visa revisar e caracterizar novos alvos antigênicos e possíveis fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis*.

## **METODOLOGIA**

A busca eletrônica foi conduzida nas bases de dados Medline/Pubmed, Lilacs e Science Direct. Foram utilizados os seguintes descritores da língua portuguesa e os seus correspondentes no idioma inglês: proteína cinase, proteína kinase, *Corynebacterinae*, *Corynebacterium*, virulence factors, antigenic targets. Não houve delimitação de período.

## **ESTADO DA ARTE**

### **PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *C. pseudotuberculosis***

Dois determinantes de virulência de *C. pseudotuberculosis* foram bem caracterizados, a exotoxina PLD e a parede celular lipídica tóxica (SONGER, 1997). A PLD uma potente exotoxina, considerada o principal fator de virulência desta bactéria, é uma proteína de 31 KDa (JOLLY, 1965a), foi caracterizada como sendo um fosfatidilcolina fosfatidilhidrolase de ação enzimática (CARNE, 1939; ONON, 1979).

Localizada na face externa da parede, a camada lipídica permite o organismo resistir à digestão por enzimas celulares e assim persistir como um parasita intracelular facultativo (BRAITHWAITE *et al.*, 1993). Esses lipídios podem também ter ação letal sobre os macrófagos por ação citotóxica direta sobre estas células (MUCKLE e GYLES 1983).

O mecanismo de ação da PLD está relacionado à dissociação da esfingomiéline, um importante componente estrutural de membrana, em colina e ceramida fosfato (HODGSON *et*

*al.*, 1999). A degradação da esfingomiéline em ceramida resulta em desorganização da membrana suficiente para causar lise celular (BROWN e OLANDER, 1987). Essa ação da PLD compromete as células do endotélio vascular, aumentando a permeabilidade vascular, favorecendo assim a disseminação do patógeno a partir do local inicial da infecção (YOZWIAK e SONGER, 1993). Desta forma, ela funciona como um fator de permeabilidade, que promove a disseminação do patógeno a partir do local inicial de infecção a todos os tecidos do corpo do hospedeiro, ao hidrolisar as ligações ésteres da esfingomiéline de membranas celulares dos mamíferos causando danos dermo-necróticos e contribuindo para a passagem da bactéria da derme para pequenos vasos sanguíneos para que ela acesse os vasos linfáticos (EGEN *et al.*, 1989). Além disso, ela é considerada uma exotoxina citotóxica para as células brancas do sangue, promovendo a destruição dos macrófagos durante a infecção experimental (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983; DORELLA *et al.*, 2009; SÁ *et al.*, 2013).

Entretanto, alguns fatores bacterianos, como a exotoxina fosfolipase D e os lipídios citotóxicos, contribuem para a patogênese a nível local, com pouca probabilidade de efeito sistêmico na doença natural (SONGER, 1997). Depois que *C. pseudotuberculosis* é capturada por células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos, o fagossomo se funde com o lisossomo, formando o fagolisossomo (BATEY, 1986b). No entanto *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo capaz de sobreviver dentro de macrófagos por mais de 48 horas. Durante esse tempo, as bactérias são liberadas, resultado de um processo que leva os fagócitos à morte, embora esta propriedade varie entre as diferentes cepas estudadas (BAIRD & FONTAINE, 2007).

Outros importantes fatores de virulência desta bactéria são os genes FagA (proteína integral de membrana), FagB (transportador de enterobactinade ferro), FagC (ATP- proteína de ligação da membrana) e FagD (sideróforos), relacionados à regulação e absorção de ferro pela *C. pseudotuberculosis* (Billington *et al.*, 2002). Embora raramente expressos *in vitro*, quando expressos *in vivo*, aumentam a virulência bacteriana, o que indica que fatores advindos do hospedeiro podem ser responsáveis pela sua expressão (SÁ *et al.*, 2013).

#### NOVOS ALVOS ANTIGÊNICOS DE *C. pseudotuberculosis*

As proteínas bacterianas secretadas e de membrana representam os principais componentes da interação do patógeno com o hospedeiro. Por esse motivo, diversos estudos são conduzidos com o objetivo de identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico. De acordo com Pacheco e colaboradores (2011), isto

fundamentou a implementação de uma abordagem combinada para caracterizar o exoproteoma de *C. pseudotuberculosis*, permitindo a identificação de 93 diferentes proteínas extracelulares, além de 11 proteínas relacionadas a diversas funções biológicas, tais como envelope celular, metabolismo respiratório e proteólise (SILVA *et al.*, 2013).

O sequenciamento de diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* forneceram dados genômicos do microrganismo Cp119 (Silva *et al.*, 2011), Cp1002 (Pinto *et al.* 2012), Cp258 (Soares *et al.*, 2012), Cp3\99-5 (Pethick *et al.* 2012b), que usados através de análises *in silico* permitiram selecionar sequências para vários estudos.

### **CP40 (endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase)**

A serina protease corinebacteriana (CP40), foi identificada anteriormente como um antígeno protetor de *C. pseudotuberculosis* (WALKER *et al.*, 1994). Esta proteína extracelular foi classificada como uma serina-protease que contribui para a virulência do parasita devido a sua atividade proteolítica (WILSON *et al.*, 1995; D'AFONSECA, *et al.*, 2008). Considera-se atualmente como sendo uma endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (SHADNEZHAD *et al.*, 2016).

A serina protease CP40, codificada pelo gene cp40 de *C. pseudotuberculosis*, foi testado em animais infectados e demonstrou propriedades imunogênicas, mostrando uma forte resposta humoral em imunotransferências e 82% redução na proporção de ovelhas infectadas e 98% redução das lesões pulmonares (WALKER *et al.*, 1994) o que sugeriu que este antígeno de 40 kDa desempenha um papel importante na imunidade da LC. Esses níveis de proteção eram semelhantes aos encontrados com outros imunogênicos, como bactérias inativadas e fosfolipase D geneticamente desintoxicada (STANFORD, *et al.*, 1998; CHAPLIN, *et al.*, 1999).

Condizente com a sequência completa do genoma de *C. pseudotuberculosis* FRC41 isolado de um linfonodo inguinal de uma menina de 12 anos com linfadenite necrosante, foi revelada a virulência de CP40, provavelmente ao afetar diretamente a função da proteína CP40 e indiretamente o crescimento do patógeno e verificaram a protease corynebacteriana (TROST *et al.*, 2010).

Droppa-Almeida (2013) avaliou a resposta imune induzida pela Cp40 recombinante em camundongos infectados por *C.pseudotuberculosis* e detectou uma ativação do sistema imune superior a induzida por vacinas comerciais.

A cp40 foi utilizada em formulação vacinal com a cepa mutante CP09 em camundongos infectados, onde a CP40 induziu resposta imune humoral quando testada individualmente ou em associação com a cepa mutante CP09, mostrando potencial para uma formulação vacinal contra LC (SILVA, 2014). Ensaio com a CP40 recombinante também obtiveram resultados favoráveis contra a LC em camundongos quando usada como imunógeno, sendo capaz de induzir uma resposta Th1 com ausência de resposta Th2 (HODGSON et al., 1994; KOWALCZYK; ERTL, 1999; NAGATA et al., 2004; SILVA *et. al.*, 2014).

### **Proteína quinase G (PknG)**

Um fator de virulência crucial para a sobrevivência intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* é a proteína quinase G (PknG), uma proteína eucariótica do tipo serina-treonina quinase expressa por micobactérias patogênicas que bloqueia a degradação intracelular de micobactérias dentro dos lisossomos. (SANTHI e AISHWARYA, 2011).

O PknG de *Mycobacterium tuberculosis* é uma proteína quinase de Ser / Thr que regula processos metabólicos chave dentro da célula bacteriana bem como vias de sinalização da célula hospedeira infectada. Esta proteína multidomínio tem um domínio de cinase canônica conservado com regiões flangeadoras N- e C-terminais de funções funcionais pouco claras (GIL *et al.*, 2013).

Como parte de importantes mecanismos de sinalização celular, proteínas quinases serina / treonina eucarióticas encontradas em bactérias são uma classe de moléculas que também merece atenção porque elas fazem parte do caminho de sinalização complexo e desempenham uma diversidade de papéis fisiológicos em processos de desenvolvimento, metabolismo secundário, divisão celular, síntese da parede celular, processos essenciais, metabolismo e virulência (PEREIRA *et al.*, 2011; FORRELLAD *et al.*, 2013).

A proteína quinase G (PknG) ganhou interesse particular porque afeta o tráfego intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos. A maioria dos patógenos e micobactérias encontram-se rapidamente nos lisossomos, onde são mortas. Em contraste, *M. tuberculosis* permanece dentro de fagossomos; a bactéria libera PknG para bloquear a fusão



fagosoma-lisossoma. As bactérias que não possuem o gene *pknG* são rapidamente transferidas para lisossomos e eliminadas (WALBURGER *et al.*, 2004; WARNER e MIZRAHI, 2007).

Desta forma a PknG bloqueia a degradação intracelular de micobactérias em lisossomos (COLE *et al.*, 2001), estando envolvido na transdução do sinal da célula hospedeira capaz de modular as vias de tráfico de macrófagos no hospedeiro (GATFIELD & PIETERS, 2003). Importante salientar, que as micobactérias que super-expressam um mutante letal da quinase PknG são rapidamente transferidos para os lisossomos e eliminados, demonstrando que a atividade da quinase PknG é crucial para a sobrevivência de micobactérias (SCHERR, *et al.*, 2007). O fato de PknG ser transladado para o citossol do hospedeiro sugere que compostos destinados a bloquear a atividade de PknG não requerem transporte através da parede celular micobacteriana permeável (WALBURGER, *et al.*, 2004, SANTHI & AISHWARYA, 2011).

O genoma de *C. pseudotuberculosis* FRC41 tem um gene de codificação para uma proteína PknG com aproximadamente 83 kDa (TROSTE *et al.*, 2010), mas sua função na bactéria ainda precisa ser investigado.

As funções relatadas da PknG incluem regulação de processos metabólicos e interferência de vias de sinalização da célula hospedeira infectada (WALBURGER, *et al.*, 2004; O'HARE, *et al.*, 2008; GIL, *et al.*, 2013). A inativação do gene PknG diminui a viabilidade celular e a virulência em modelos animais e sugere um papel central no controle dos níveis intracelulares de glutamato / glutamina (COWLEY, *et al.*, 2004). Demonstrou-se ainda que PknG participa na regulação do metabolismo do glutamato através da fosforilação endógena de um substrato (GarA), com funções semelhantes às relatadas para PknG no actinomiceto relacionado *Corynebacterium glutamicum* (NIEBISCH, *et al.*, 2006; O'HARE, *et al.*, 2008). PknG também é um fator de virulência que medeia a sobrevivência de *M. tuberculosis* dentro das células hospedeiras, evitando a fusão de fagosoma-lisossoma de macrófagos (WALBURGER, *et al.*, 2004). Além disso, a inibição da atividade de PknG produz bactérias mais suscetíveis à degradação intracelular (WALBURGER, *et al.*, 2004). Devido aos processos celulares críticos que controla, a inibição de PknG emergiu como uma estratégia atraente para a descoberta de drogas. O principal desafio é alcançar a seletividade para a inibição de PknG, uma vez que os mecanismos catalíticos o dueto de proteínas quinase Ser / Thr ativa são conservados de procariotos a eucariotos.

## SpaC Pilina

*Pili* de superfície celular desempenha papel fundamental na colonização bacteriana e patogênese (SAUER, *et. al.*, 2000; MANDLIK, *et. al.*, 2008). O mecanismo de montagem do pilus no *pili* Gram-negativo é bem compreendido (THANASSI & HULTGREN, 2000). Muitos agentes patogênicos Gram-positivos exibem vários tipos de *pili* (MISHRA *et. al.*, 2007). Ao contrário de *pili* Gram negativos, o *pili* bacteriano Gram-positivo trata-se de polímeros reticulados que estão ligados covalentemente à peptidoglicano de parede celular (TON-THAT & SCHNEEWIND, *et. al.*, 2004; MANDLIK *et. al.*, 2008;). Os vários *pili* Gram-positivos são montados por um mecanismo fundamentalmente parecido que requer classificar (TON-THAT, & SCHNEEWIND, *et. al.*, 2004; TELFORD *et. al.*, 2006; MARRAFINI, *et. al.*, 2006), uma transpeptidase encontrada em praticamente todos os microorganismos gram-positivos (COMFORT & CLUBB, 2004; DRAMSI, *et. al.*, 2005). *C. diphtheriae* expressa três diferentes *pili* heterotriméricos e um total de seis tipos, dos quais cinco (SrtA-E) são essenciais para a polimerização específica de *pilus*, e eles são coexpressos com as respectivas pilinas (MANDLIK, *et. al.*, 2008). O sexto (SrtF) é conhecido como o tipo de arrumação (TON-THAT *et. al.*, 2003). O primeiro gene de pilus caracterizado em *C. diphtheriae* (*spaA-srtA-spaB-spaC*) codifica o *pili* do tipo SpaA. Este protótipo de pilus é montado por uma ligação covalente cruzada da principal SpaA pilina formando o eixo, juntamente com o Spa Pilin menor localizado na ponta, e outro *pili* menor, SpaB (TON-THAT, *et. al.*, 2003). Quando o SpaA é superproduzido, há muito tempo, *pilis* são formados que contêm SpaC na ponta e SpaB intercalados ao longo do eixo (TON-THAT *et. al.*, 2003). Os *pilis* menores também são exibidas na superfície celular e facilitam a aderência corynebacteriana às células epiteliais da faringe (MANDLIK *et. al.*, 2007; MANDLIK, *et. al.*, 2008).

A sequência completa do genoma de uma estirpe *C. pseudotuberculosis* (FRC41) isolado de uma menina de 12 anos de idade com linfadenite necrosante permitiu a identificação de *spaC* e *nanH* como genes que codificam proteínas consideradas como potenciais fatores de virulência (TROST *et. al.*, 2010).

O SpaC é uma proteína de ponta tipo *pili*. A estrutura do *pilus* provavelmente pode fazer o contato inicial com os receptores das células hospedeiras permitindo interações adicionais ligante-receptor para facilitar a eficiência de fatores de virulência e invasão intracelular (ROGERS, *et. al.*, 2011).

### **Neuraminidase H (NanH)**

NanH, por sua vez, é tida como uma promissora neuraminidase extracelular (TROST, *et al.*, 2010). Neuraminidases, ou sialidases, pertencem a uma classe de hidrolases de glicosil que catalisam a remoção de resíduos de ácido siálico terminal de uma variedade de glicoconjugados e que pode contribuir para o reconhecimento de ácidos siálicos expostos nas superfícies das células hospedeiras. A maioria dos microorganismos produtores de sialidase são patogênicos ou comensais quando em contato próximo com hospedeiros de mamíferos (SANTANA-JORGE, *et al.*, 2016). Sugere-se também que, em alguns tipos de bactérias patogênicas, as sialidases funcionam como potenciais fatores de virulência que contribuem para o reconhecimento de ácidos siálicos expostos na superfície da célula hospedeira (KIM, *et al.*, 2011). Uma homóloga NanH FRC41 de *C. pseudotuberculosis* foi caracterizada em *C. diphtheriae* KCTC3075 e mostrou ser uma proteína contendo neuraminidase e atividades trans-sialidase (KIM, *et al.*, 2010).

### **SodC (Superóxido Dismutase C)**

Superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), uma metaloenzima antioxidante, catalisa a dismutação de ânions radicais de superóxido para dióxigênio e peróxido de hidrogênio; sendo o último quebrado em água por catalase ou peroxidase. Esta SOD tem sido encontrada na maioria dos organismos, aeróbicos e anaeróbicos, e desempenha um papel fundamental na proteção celular contra condições de estresse oxidativo (FRIDOVICH, 1995).

As SODs são distinguidas em vários tipos dependendo do tipo de cofactores metálicos. SOD contendo tanto o manganês (Mn-SOD) como o ferro (Fe-SOD) foi encontrado no citoplasma de células procarióticas e tem sequências e estruturas muito semelhantes (KEELE, *et al.*, 1970; YOST e FRIDOVICH, 1973). O SOD contendo cobre e zinco (Cu, Zn-SOD) foi descrito no periplasma de patógenos e bactérias endossimbíóticas e são evolutivamente não relacionados a Mn, Fe-SODs (BECK *et al.*, 1990; BEYER *et al.*, 1991; TOUATI, 1997; WU *et al.*, 1998; BATTISTONI *et al.*, 2000). Além disso, duas novas SODs contendo níquel (Ni-SOD) ou contendo ferro e o zinco (FeZn-SOD) caracterizam-se como enzimas citoplasmáticas de *Streptomyces griseus* e *Streptomyces coelicolor* (YOUN, *et al.*, 1996; KIM, *et al.*, 1996). Outro tipo de metaloproteína pequena com atividade de superóxido dismutase, não relacionada às SOD clássicas, também foi identificado recentemente na bactéria de sulfobactéria de redução de sulfato (SILVA *et al.*, 1999; EL SHAFEY, *et al.*, 2006).

De acordo com Trost e colaboradores (2010), o genoma de *C. pseudotuberculosis* FRC41 também codifica uma superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (SodC). A localização extracelular desta enzima sugere que pode proteger a superfície de células de *C. pseudotuberculosis* contra o superóxido gerado externamente pelas células hospedeiras de mamíferos (SANTANA-JORGE, *et al.*, 2016).

A superóxido dismutase (SOD) de *Corynebacterium glutamicum* foi purificada e caracterizado como sendo uma enzima de peso molecular nativo de cerca de 80 kDa (EL SHAFEY, *et al.*, 2006).

A SodC contribui para a resistência em *M. tuberculosis*, contra os produtos de explosão oxidativa gerados por macrófagos ativados (DUSSURGET, *et al.*, 2001; PIDDINGTON, *et al.*, 2001). Assim, a atividade protetora de Cu, Zn-SODs tem sido associada à virulência em outras bactérias, como *Neisseria meningitides* e *Hemophilus ducreyi* (TROST, *et al.*, 2010). Com respeito aos importantes mecanismos de sinalização celular, as proteínas quinases de serina e treonina, semelhantes a eucarióticos, em bactérias são uma classe de moléculas que também merecem atenção, uma vez que fazem parte de vias de sinalização complexas e desempenham uma diversidade de papéis fisiológicos no metabolismo secundário, divisão celular, síntese de parede celular, processos essenciais no metabolismo central e virulência (PEREIRA, *et al.*, 2011; FORRELLAD, *et al.*, 2013).

### **Antígenos recombinantes rCP5582 e rCP7041**

A fim de acelerar a identificação de novos alvos antigênicos, o uso concomitante de dados genômicos, proteômicos e da bioinformática são consideradas ferramentas importantes a serem usadas para o diagnóstico, vacinas e medidas de controle da linfadenite caseosa (KAUFMANN *et al.*, 2014). Neste sentido, o sequenciamento de diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* fornecem dados genômicos do microrganismo Cp119 (SILVA *et al.*, 2011), Cp1002 (PINTO *et al.*, 2012), Cp258 (SOARES *et al.*, 2013), Cp3\99-5 (PETHICK *et al.* 2012), que usados através de análises *in silico* permitiram selecionar sequências para vários estudos.

Neste contexto, o Corynebase (HEYDARI *et al.*, 2014), um banco de dados genômicos de *Corynebacterium* que contém mais de 165 mil sequências codificadoras, foi utilizado para a seleção de seis *ORFs* (*Open Reading Frame*) com cadeias peptídicas contendo de 332 a 966 aminoácidos, cujos produtos gênicos secretados ou associados à

membrana externa, são potenciais candidatos para desenvolver vacinas e testes de diagnósticos, visto que são antígenos imunogênicos (BRITO, 2016).

Brito (2016) utilizando ferramentas de bioinformática e a metodologia da biologia molecular identificou, clonou os genes e expressou duas proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis* denominadas rCP5582 e rCP7041. Estas proteínas quando inoculadas isoladamente em camundongos induziram uma resposta imune humoral fraca, quando avaliados os níveis de DO. através do ensaio imunoenzimático ELISA, entretanto, os níveis aumentaram de modo significativo quando a formulação vacinal, foi composta associado à rCP40 recombinante, certamente indicando o expressivo papel imunogênico desta serino-protease.

Neste mesmo estudo, observou-se que as proteínas rCP5582 e rCP7041, são capazes de induzir resposta imune humoral em modelo murino, o que já era conhecido para outras proteínas recombinantes como rCP40 (DROPPA *et al*, 2015) e CP09 (SILVA *et al*, 2014).

De acordo com estes achados, as proteínas recombinantes rCP5582 e rCP7041 também estão sendo consideradas possíveis alvos antigênicos para a indução de imunoproteção contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das características já expostas da diversidade de antígenos aqui mencionados percebe-se que muitas são as possibilidades e alvos a serem explorados. Desta forma CP40, já está considerada como um importante alvo antigênico, enquanto que SpaC, NanH, SodC, e as PknG de *C. pseudotuberculosis*, melhor estudados podem também se tornar promissores alvos antigênicos, com papéis significativos na virulência e patogênicidade desta bactéria nos hospedeiros pequenos ruminantes.

**ARTIGO 02****Avaliação do papel das vias ERK 1 / 2 , MAPK p38 e JNK 1 , 2 e 3 na Produção de Óxido Nítrico em Esplenócitos de Camundongos Infectados sob Estimulo de Antígenos Recombinantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.**

SANTOS<sup>1</sup>, Heidiane Alves; COSTA-SILVA, Marcos; BRITO, Ioná; SALES, Tatiane Santana; SOUZA, Andréia Pacheco; PEDRAL, Geraldo; TRINDADE, Soraya Costa; VALE, Vera Lucia Costa; MEYER, Roberto.

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia : Departamento de Biointeração - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências de Saúde, Av.Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

**RESUMO**

A linfadenite caseosa (LC) é uma enfermidade que afeta caprinos e ovinos, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, relacionada filogeneticamente a *Mycobacterium tuberculosis*. A LC é uma das doenças de grande importância econômica para a caprinovinocultura. É caracterizada pela formação de granulomas nos gânglios linfáticos e órgãos internos de animais infectados. A imunidade contra *C. pseudotuberculosis* envolve tanto aspectos da imunidade celular quanto da imunidade humoral, e embora esta última seja intensa, sozinha é incapaz de debelar a infecção. As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) são uma subfamília de proteína quinases específicas de serina / treonina que são expressas por todos os tipos de células e respondem a estímulos extracelulares (mitógenos) que medeiam à transdução de sinal dos receptores da superfície celular aos núcleos. Considerando-se que a participação do óxido nítrico é essencial para eliminação deste patógeno, este estudo utilizou esplenócitos de camundongos Swiss infectados visando avaliar o envolvimento das proteínas quinases MAPK p38 e ERK1 e 2 e JNK 1,2,3 na produção de óxido nítrico *in vitro* sob estimulação por antígenos recombinantes desta bactéria. Neste trabalho foram utilizados camundongos Swiss (n = 12) divididos em dois grupos, um deles foi infectado com 10<sup>2</sup> unidades de formadoras de colônias (UFC) de estirpe virulenta ER1409 e outro controle (sem infecção). Os esplenócitos murinos foram tratados com inibidores específicos (inibidor de MAPK p38, inibidor ERK 1/2 ou inibidor da JNK 1, 2,3) e cultivados sob estímulo dos antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* (rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582-G04-, rCP7041-G10). Os resultados demonstram diferenças nos níveis de óxido nítrico entre os grupos (controle e infecção) nas condições de cultivo empregadas: branco (células), estímulos e inibidores das vias MAPK (p<0,001).

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, óxido nítrico, antígenos recombinantes, MAPK.

## INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecciosa crônica 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, a fosfolipase D (HODGSON, 1999). A bactéria, ao penetrar no organismo do hospedeiro é carregada pelas 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 imunidade contra *C. 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 quinases ativadas por mitógenos (MAPK) são uma subfamília de proteína quinases específicas de serina / treonina. Os MAPKs são expressos por todos os tipos de células e respondem a estímulos extracelulares (mitógenos) que medeiam à transdução de sinal dos receptores da superfície celular aos núcleos (NUMAZAWA *et al.*, 2003, SOUZA, *et al.*, 2007; SON *et al.*, 2011). MAPKs, parte de um sistema de fosforilação no qual três as cinases são ativadas sequencialmente (JOHNSON e LAPADAT *et al.*, 2002; BOUTROS, *et al.*, 2008), são expressas em células de mamíferos e traduzem sinais em resposta a fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e condições de estresse. Três subfamílias de MAPKs foram bem caracterizadas: MAPK p38, que contém quatro isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ); ERK, a quinase regulada por sinalização extracelular, com isoformas p44 (ERK1) e P42 (ERK2); E a proteína quinase c-jun N-terminal, com isoformas, JNK 1, JNK 2 e JNK 3 (ONO e HAN, 2000; SOUZA, *et al.*, 2007; BROWN e SACKS, 2009).

MAPK p38 regula a expressão de várias citocinas, é ativado em células imunes por citocinas inflamatórias e desempenha um papel importante na ativação da resposta imune do hospedeiro (KIM, *et al.*, 2008). ERK 1 e 2 são amplamente expressas e envolvidas na regulação da meiose, mitose e funções pós-mitóticas em uma variedade de células. Por sua vez, JNKs são fortemente ativadas em resposta a citocinas, irradiação UV, privação de fatores de crescimento, agentes prejudiciais ao DNA e, em menor grau, alguns receptores acoplados a proteínas G, soro e fatores de crescimento (KYRIAKIS e AVRUCH, 2001; ROUX e BLENIS, 2004).

O presente estudo empregou esplenócitos de camundongos *Swiss* para avaliar o envolvimento das proteínas cinases MAPK p38 e ERK1 e 2 e JNK 1,2,3 na produção de Óxido Nítrico *in vitro* sob estimulação por antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Cultivo da linhagem bacteriana de *Corynebacterium pseudotuberculosis***

A estirpe ER1409 foi recentemente isolada de um caprino naturalmente infectado da Fazenda Experimental da UFBA, localizada na região de Entre Rios-BA, e doado ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA) no ano 2016. A identificação prévia da linhagem foi realizada pelo método de Gram, cultura de *Corynebacterium spp*, hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* (Egen *et al.*, 1989) e análises bioquímicas (API Coryne Biomérieux, SA, Marcy-l'Etoile França), sendo realizada adicionalmente na sorologia para Linfadenite Caseosa.

Para proceder à infecção dos animais testados, foi realizada a quantificação bacteriana, seguindo o protocolo de Pedral (2012). Resumidamente, foram retirados 05 mL dos 250ml de uma cultura mantida por 48h a 37°C. Este material foi lavado duas vezes, em solução salina, através de centrifugações de 04 min. a 8.000xg. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescido o SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e incubou-se por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Logo após foi realizada uma nova lavagem para a remoção dos reagentes e o *pellet* bacteriano foi ressuspenso e mensurado no citômetro de fluxo. Para isso, foram utilizados tubos TruCount (Becton Dickson, EUA), contendo *pellet* de microesferas fluorescentes, com a quantidade de *beads* constantes em cada lote. A concentração bacteriana foi estabelecida seguindo o seguinte cálculo: Bactérias totais =  $(N^{\circ}beads \text{ eventos bactérias} / N^{\circ} \text{ de } beads \text{ A+B}) \times N^{\circ} \text{ de } Beads \text{ por } \mu\text{l}$ .

### **Animais**

Na realização dos experimentos foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, doados pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Escola de Medicina Veterinária (Biotério) - Universidade Federal da Bahia (MEV-UFBA): Salvador - BA com idade aproximada de 6 a 8 semanas, de ambos os sexos.



Os animais foram alojados em caixas de criação com 30x19,5x12 cm, quatro a seis animais por caixa, durante todo o período do experimento, no Biotério do Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA), sob condições adequadas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e de umidade (50 - 60 %), luminosidade e livres de patógenos. Estes foram alimentados com ração balanceada, sendo mantidos com alimentação e água *ad libitum*.

A utilização do modelo murino deu-se devido à escassez de reagentes específicos para dosar biomoléculas relacionadas com a imunorregulação em pequenos ruminantes, principais hospedeiros naturais de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, além da infecção experimental de camundongos reproduzirem os principais aspectos observados em caprinos e ovinos. A linhagem utilizada apresenta uma doença moderada, quando comparada, por exemplo, com aquela desenvolvida por camundongos de outras linhagens.

Este estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, sob o protocolo nº 106/2016.

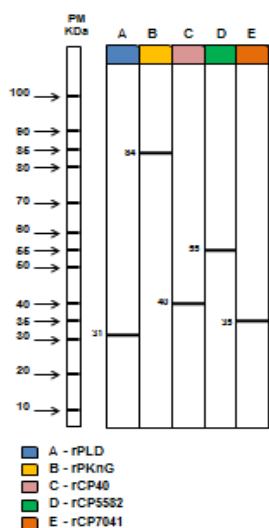
### ***Obtenção das Proteínas Recombinantes e Linhagens bacterianas***

As proteínas recombinantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, aqui utilizadas, rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582(G04), rCP7041(G10) foram expressas e purificadas seguindo protocolos experimentais padronizados pelo Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas da UFPel, Laboratório de Genética Celular e Molecular da UFMG e Departamento de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde UFBA, sendo então cedidas para o uso neste estudo.

Como linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho tem-se *C. pseudotuberculosis* 1002, *Escherichia coli* TOP10 e *E.coli* BL21 Star, cedidas pelo Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas da UFPel. *C. pseudotuberculosis* 1002 foi cultivada em meio “Brain Heart Infusion” (BHI) suplementado com Tween 80 a 0,5 %, por 72 h a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) ou LB-Ágar por 16h a  $37^\circ\text{C}$ , acrescido, quando necessário, de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina.

### ***Análise eletroforética das proteínas recombinantes de C. pseudotuberculosis em SDS-page***

Os antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis*, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentaram 05 pesos moleculares que variam de 10 até aproximadamente 84 KDa (figura 3).



**Figura 3:** Desenho esquemático de eletroforese em gel de poliacrilamida dos antígenos recombinantes de *C.pseudotuberculosis*. Os números se referem aos pesos moleculares em KDa. PM: Peso molecular. rPLD = Fosfolipase D recombinante; rPKnG = proteína kinase G recombinante; rCP40 = serina protease secretada recombinante; rCP5582 = proteína recombinante G04; rCP7041 = proteína recombinante G10.

### Infecção Experimental

Foram utilizados 12 camundongos, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Escola de Medicina Veterinária (Biotério) - Universidade Federal da Bahia (UFBA): Salvador - BA com idade aproximada de 6 a 8 semanas, de ambos os sexos. O protocolo experimental foi delineado com a infecção de 06 animais com  $10^2$  CFU da cepa virulenta ER1409 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, injetadas por via intraperitoneal, sendo também injetada solução salina sob as mesmas condições 06 animais do grupo controle. A determinação da dose utilizada para a promoção da infecção,  $1 \times 10^2$  de ER1409 foi estabelecida com o objetivo de promover o desenvolvimento de uma patologia crônica, entretanto sem ocasionar mortalidade nos animais. No tempo 0 e 30 dias após a infecção experimental, foi coletado sangue para acompanhamento sorológico destes animais e análise da produção de imunoglobulina G, e 06 camundongos foram eutanasiados em cada tempo para o cultivo de esplenócitos, tratamento com inibidores das vias MAPK e estímulo proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis*. No decorrer do experimento foi feito o acompanhamento da evolução da doença.

## **Ensaio com células esplênicas**

### ***Obtenção dos linfócitos***

Nos tempos 0 e 30 dias os animais eutanasiados de ambos tiveram os baços removidos assepticamente e lavados duas vezes em Meio RPMI 1640 (Sigma). As células esplênicas foram coletadas por diluição em meio RPMI (3mL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Em seguida as células obtidas foram diluídas 1:100 (30µl de ácido acético, 960 µl de PBS e 10 µl de célula) e contadas em contador automático de células.

### ***Cultivo dos linfócitos***

As células esplênicas foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de  $10^6$ /mL. Foram adicionados à placa os antígenos recombinantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis* [rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582(G04), rCP7041G10)] em uma concentração de 10µg por poço, com 1000uL (meio de cultura + células + inibidores). Na cultura de células, para o tratamento com os inibidores das vias MAPK, foram utilizados 4 poços por antígeno, onde foram usados um poço controle com o antígeno recombinante e sem os inibidores, e três poços os inibidores usados individualmente (MAPK p38 e ERK 1 / 2; e JNK 1/2/3), repetindo este desenho para cada um dos cinco antígenos recombinantes testados. Como controle positivo da cultura foi adicionado às células o mitógeno *pokeweed* (PWM) na concentração de 5µg por poço, com 1000uL. Para o controle negativo foram utilizadas células sem estímulo dos antígenos recombinantes e ausência dos inibidores MAPK.

Posteriormente estas células foram incubadas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37° C por 48 horas. Após este período de incubação o conteúdo dos poços foi coletado, centrifugado e o sobrenadante armazenado a -20° C para posteriores dosagens.

### ***Tratamento com Inibidores da MAPK p38, ERK 1 / 2 e JNK 1 , 2 e 3***

As células esplênicas foram expostas aos seguintes inibidores específicos: 1) SB203580 (inibidor da via MAPKp38); 2) U0126 (inibidor da ERK 1 / 2); e 3) SP600125 (inibidor da via JNK 1/2/3), todos da *Sigma-Aldrich*, utilizados na concentração de 40nM, por 1 hora antes da estimulação com os antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis*,

seguindo o recomendações do fabricante. Após o referido tempo, foi feita incubação por 48h, coleta, centrifugação e armazenamento do sobrenadante como descrito acima, para dosagem de óxido nítrico, conforme protocolo de Souza, *et al.* (2014).

### ***Dosagem de Óxido Nítrico***

A dosagem de Óxido Nítrico foi realizada pelo método de Griess, no qual em tubos numerados de 1 a 11 (padrão) foram colocados 392µl de meio RPMI e 8µl de nitrito com diluição 1:50 no tubo 1, e 200µl de meio RPMI nos demais tubos. Em seguida foi feita diluição seriada de 1:2, sendo retirado 200 µl do tubo 1 e passar para o tubo 2, do 2 para o 3 e assim por diante até o tubo 11 que deverá ficar com 200 µl ao final. Isto feito, usando uma placa de 96 poços (ELISA) foram adicionados 50 µl do padrão nos poços, 50 µl de meio para o branco, em duplicata e 50 µl da amostra teste também em duplicata. Por fim adicionou-se 50 µl por poço do reagente de cor preparado - NEED (*N-1-Naphtylethylenedamina*) 0,1% e Sulfanilamida 1% na proporção 1:1), e homogeneizou-se a placa com batidas leves. Procedeu-se a incubação da placa por um tempo médio de 10 a 15 minutos e fez-se a leitura em espectrofotômetro num filtro de 490nm.

### **Análise Estatística**

Os dados foram processados utilizando o software *SPSS 17.0 for Windows* (Copyright © SPSS Inc. 1989). Para análise comparativa dos grupos foi utilizado o teste ANOVA com pós-ROC de Tukey.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Objetivando caracterizar o papel das vias ERK 1 / 2, MAPK p38 e JNK 1, 2 e 3 na resposta imune estabelecida frente à indução de antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* em camundongos, infectados com 10<sup>2</sup> UFC da bactéria virulenta e acompanhados por 30 dias.

Por se tratar de uma cepa nova de *C. pseudotuberculosis*, após o isolamento e procedidos os testes bioquímicos da bactéria, para determinar a dose ideal de inoculação,

foram realizados testes em um estudo piloto com diferentes concentrações desta cepa em condições semelhantes ao estudo realizado (dados não mostrados).

O presente protocolo experimental foi utilizado para avaliar o envolvimento das vias MAPK induzidas por antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis*, na produção de óxido nítrico, em modelo murino.

**Ação de inibidores específicos das vias mapk na produção *in vitro* de óxido nítrico (NO) por esplenócitos murinos após estímulo com antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis*.**

Os mecanismos específicos de morte celular causada por *C. pseudotuberculosis* ainda não estão claros, mas a capacidade das bactérias de sobreviver dentro de macrófagos é atribuída à incapacidade de várias populações de macrófagos para a produção de óxido nítrico em resposta a essa bactéria *in vivo* (BOGDAN *et al.*, 1997). Estes efeitos podem estar associados com a presença da camada lipídica externa em *C. pseudotuberculosis* e outros componentes antigênicos, que interromperiam a produção de óxido nítrico pelos macrófagos (BASTOS *et al.*, 2012).

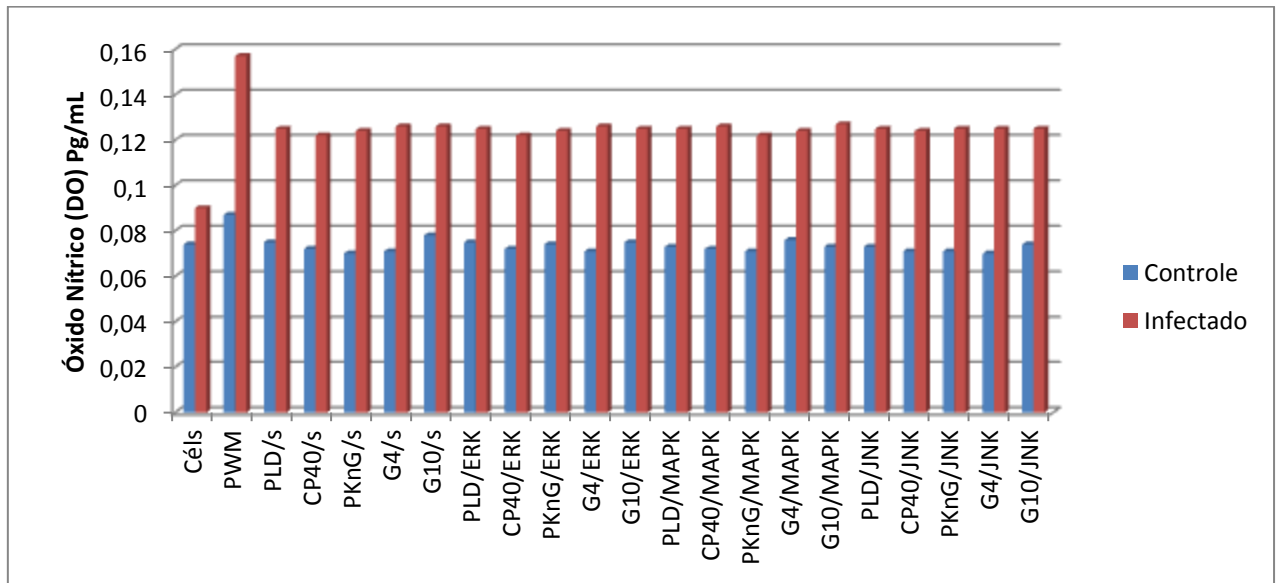
Neste sentido, o óxido nítrico (NO), gás solúvel altamente lipofílico, produzido pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), assume atuação importante na eliminação dos microrganismos fagocitados pelos macrófagos na infecção por *C. pseudotuberculosis*.

Os macrófagos produzem NO, um composto químico que está relacionado, entre outros fatores biológicos, com a reação do sistema imune, atuando como agente na eliminação de patógenos intracelulares (VILHENA, 2006). O óxido nítrico liberado pela célula é tóxico e pode matar também microrganismos que estiverem próximos ao macrófago (MAYER, 2006).

Considerando-se que a participação do óxido nítrico é essencial para eliminar *C. pseudotuberculosis*, investigamos se a diferença observada entre os grupos infectado e controle em relação à atividade microbicida no tempo de 48 horas poderia estar relacionada à capacidade de produção do NO. Assim, utilizamos o método de Griess para dosar a concentração de NO nos sobrenadantes dessas culturas.

Na figura 04 a análise demonstra diferenças nos níveis de NO entre os grupos (controle e infecção) nas condições de cultivo empregadas: branco (células), estímulos e inibidores das vias MAPK ( $p < 0,001$ ). Todavia, não houve diferença estatisticamente

significativa nos níveis de NO entre os inibidores das vias MAPK p38, ERK 1 / 2 e JNK 1, 2 e 3 em nenhuma das situações analisadas. Nossos resultados, demonstram produção de NO por todas as proteínas recombinantes em camundongos com 30 dias de infecção.



**Figura 4:** Nível de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de cultura de esplenócitos murinos tratados com os inibidores da MAPK p38, ERK 1 / 2 e JNK 1, 2 e 3 sob estímulo dos antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582 (G04), rCP7041 (G10). O gráfico representa a análise entre os grupos (infectado x controle). Controle: tempo zero. Infectados: 30 dias. ( $p < 0,001$ ).

Os resultados com maiores níveis de NO nos animais infectados (fig. 04) reafirmam que o NO produzido por macrófagos é um importante agente na eliminação de patógenos intracelulares e a não produção desse efetor em resposta aos componentes bacterianos explicaria o desenvolvimento de infecções exclusivamente crônicas observadas em pequenos ruminantes (GREEN; NACY; MELTZER, 1991). A incapacidade do macrófago em destruir *C. pseudotuberculosis* pode estar relacionada à não produção do NO quando essas células estão sob estímulo dos antígenos desse patógeno (BROGDEN *et al.*, 1990; OLIVEIRA-NETO, 2011).

Vale *et al.* (2016), também avaliaram a produção de NO em células esplênicas de camundongo encontrando valores maiores do que o observado neste experimento, entretanto, as linhagens de camundongos e bacterianos foram diferentes.

Um experimento de Oliveira Neto em 2011 realizado com camundongos C57/Black6 selvagem e C57/Black6 *Knockout* para o óxido nítrico (KO-NO), comprovaram que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, já que todos os animais testados morreram após o desafio com a amostra virulenta de *C. pseudotuberculosis* na dose de  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Entretanto, apesar do presente estudo não evidenciar influência das vias MAPK na variação dos níveis NO entre os grupos, outros componentes da resposta imunológica a este patógeno devem ser considerados, e foram relatados em estudos anteriores, reforçando a importância destas vias na infecção por *C. pseudotuberculosis*. Souza *et al.* (2014) estudando camundongos CBA infectados com uma cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis* por 30 dias revelou uma inibição estatisticamente significativa ( $P = 0,016$ ) na produção de TNF- $\alpha$ . Neste estudo isso foi induzido apenas pelos inibidores de MAPK p38 e ERK 1/2 sob estímulo de antígenos secretados / excretados.

Em, um estudo anterior realizado por Sim *et al.* (2012) foi encontrado que a infecção *in vitro* por *M. avium* nos monócitos de pacientes saudáveis conseguiram ativar com sucesso as vias MAPK p38 e ERK 1/2 e regularam positivamente a produção de TNF- $\alpha$ . No entanto, esse mesmo estudo também empregou monócitos de pacientes doentes com abscessos e descobriu que a infecção *in vitro* com *M. avium* diminuiu a expressão de MAPK p38 e ERK 1/2, além de reduzir a produção de TNF- $\alpha$ . Tais autores demonstraram que a ativação insuficiente da via MAPK p38 em resposta a patógenos micobacterianos podem representar um mecanismo importante, devido à regulação negativa da resposta imune do hospedeiro, permitindo assim que o patógeno persista intracelularmente.

Todavia, modelos de estudos empregando uma variedade de parasitas intracelulares sugerem que nenhuma das vias MAPK estudadas estavam envolvidas na produção de IFN- $\gamma$ , e reafirmam, porém o envolvimento de MAPK p38 e ERK 1/2 na produção de citocinas pró-inflamatórias e / ou regulatórias (LEWTHWAIT *et al.*, 2007; SAMPAIO *et al.* 2008; RAJARAMA *et al.* 2011; SOUZA *et al.* 2014).

De acordo com Rocco & Irane (2011) a interferência na sinalização intracelular é fundamental para a estratégia de virulência em patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis* e *M. avium*.

Considerando-se o fato de *M. tuberculosis* ser um microorganismo em grande parte filogeneticamente semelhante a *C. pseudotuberculosis*, tem-se que conjuntamente, os resultados apresentados em estudos anteriores indicam que na ativação precoce da via MAPK p38, o caminho pode ser um mecanismo comum pelo qual organismos micobacterianos virulentos reprimem a resposta antimicrobiana de células hospedeiras susceptíveis, permitindo que patógenos persistam intracelularmente (KOUL, *et al.*, 2004).

Adicionalmente, dados *in vivo* sobre o papel da cascata MAPK p38 em infecções micobacterianas originárias de um estudo envolvendo o tratamento de camundongos infectados com micobactérias patogênicas com inibidor de MAPK p38 SB203580 (VAN

DEN, *et. al.*,2001), mostraram nos animais tratados um aumento na sobrevivência de micobactérias patogênicas em vários órgãos, mas também aumentou os níveis de citocinas. Esses resultados implicam que a inibição da via p38 desempenha um papel na melhorada sobrevivência da bactéria. No entanto, o aumento observado nos níveis de citocinas pode ser devido à inibição de quinases que não são MAPK P38 por SB203580 (GODL *et. al.*, 2003; KOUL *et. al.*, 2004).

Diferentes estudos avaliando a produção de NO têm demonstrado que ocorre a produção dessa substância em diferentes linhagens de camundongos infectados com diferentes linhagens bacterianas, utilizando antígenos somáticos e secretados, entretanto, utilizando antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* este é o primeiro desenvolvido e como observado, todos os antígenos testados estimularam a produção do NO. Devido a LC ser uma doença crônica, faz-se necessário aumentar o tempo de infecção para podermos entender melhor as vias de sinalização para a produção de NO.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando uma bactéria invasora é detectada pelo hospedeiro, o lançamento de citocinas pró-inflamatórias resulta em dano tecidual local e melhor recrutamento potencial de células de defesa para a infecção. A ativação de cascatas de sinalização de célula do hospedeiro, como MAPK ou JAK / STAT (Janus kinase / transdutor de sinal e ativador da transcrição), resulta na produção citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Micobactérias patogênicas ao contrário das não patogênicas desenvolveram mecanismos para suprimir esse sinal cascatas de transdução e assim atenuar a resposta imune induzida por citocinas.

Resumidamente, estudos comprovam que micobactérias patogênicas desenvolvem mecanismos para prevenir ativação sustentada de cascatas ERK1 / 2 e p38, e isso explica, pelo menos em parte, e sua sobrevivência. Embora as micobactérias residam principalmente em macrófagos, e macrófagos ativados são uma proteção contra *M. tuberculosis*, granulócitos polimorfonucleares têm um papel protetor significativo na fase inicial desta infecção.

Desta forma, é possível que a manipulação adicional das vias MAPK nos moldes apresentados no presente estudo, possa conduzir a uma melhor compreensão dos mecanismos de escape usados por *C. pseudotuberculosis* para evadir a resposta imune do hospedeiro durante a infecção. Assim, estudos adicionais, com maior tempo de infecção, devem ser conduzidos para validar estes pressupostos hipotéticos.



## ARTIGO 03

### **Avaliação da Produção de Imunoglobulina G, suas subclasses e da expressão dos marcadores CD3/CD4+, CD3/CD8+ e FOXP3 em Células Esplênicas Camundongos Infectados com a Linhagem Selvagem ER1409 de *C. pseudotuberculosis*, estimulados com Antígenos Recombinantes desta Bactéria.**

SANTOS<sup>1</sup>, Heidiane Alves; COSTA-SILVA, Marcos; BRITO, Ioná; SALES, Tatiane Santana; SOUZA, Andréia Pacheco; PEDRAL, Geraldo; TRINDADE, Soraya Castro; VALE, Vera Lucia Costa; MEYER, Roberto.

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia : Departamento de Biointeração - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências de Saúde, Av.Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

## RESUMO

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) uma doença infecto contagiosa crônica, transmitida principalmente através da pele, acomete pequenos ruminantes. A LC é caracterizada pela formação de granulomas em linfonodos externos e internos e em vísceras como os pulmões, rins e fígado, e sua disseminação nos rebanhos é expressiva com perdas econômicas evidentes. A resistência adaptativa à infecção causada por bactérias intracelulares facultativas tais como *C. pseudotuberculosis*, está relacionada às células T CD4<sup>+</sup> e, mais especificamente, aos clones que produzem as citocinas de tipo Th1. A dinâmica da resposta imunológica à infecção só pode ser compreendida se houver a caracterização das proteínas bacterianas responsáveis pela indução da resposta imune do hospedeiro. Neste estudo foram usados camundongos Swiss (n = 12) divididos em dois grupos, foi infectado com 10<sup>2</sup> unidades de formadoras de colônias (UFC) de estirpe virulenta ER1409 e outro controle (sem infecção). Os esplenócitos murinos foram cultivados sob estímulo dos antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* (rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582-G04-, rCP7041-G10). Observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os animais infectados e controles nos níveis de IgG total (p<0,001), IgG2a(p<0,001), IgG2b(p<0,001) e IgG3(p<0,001). Analisando a média de intensidade de fluorescência (MIF) do marcador CD4+ não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (infecção X controle) para qualquer um dos antígenos recombinantes testados. Foi encontrado ainda diferença entre os grupos (controle x infecção) apenas quando o antígeno G04 (rCP5582) foi usado como estímulo (p=0,011). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de FOXP3 entre os grupos (controle e infecção) em nenhum dos estímulos/inibidores utilizados.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Antígenos Recombinantes, IgG, FOXP3

## INTRODUÇÃO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo de macrófagos que se destaca na pecuária mundial por ser o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) em caprinos e ovinos (BINNS *et al.*, 2002; ARSENAULT *et al.*, 2003; PATON *et al.*, 2003). A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto contagiosa crônica, transmitida principalmente através da pele, acomete pequenos ruminantes, é caracterizada pela formação de granulomas em linfonodos externos e internos e em vísceras como os pulmões, rins e fígado (BAIRD & FONTAINE, 2007; KURIA *et al.*, 2001; PEKELDER, 2000). A disseminação da linfadenite caseosa nos rebanhos é expressiva e o prejuízo é significativo com perdas econômicas evidentes.

A resistência adaptativa à infecção causada por bactérias intracelulares facultativas tais como *C. pseudotuberculosis*, está relacionada às células T CD4<sup>+</sup> e, mais especificamente, aos clones que produzem as citocinas de tipo Th1, principalmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas pró-inflamatórias aumentam a atividade bactericida de macrófagos e ativam linfócitos T CD8<sup>+</sup> (SILVA *et al.*, 2001; VALE *et al.*, 2016).

A dinâmica da resposta imunológica à infecção só pode ser compreendida se houver a caracterização das proteínas bacterianas responsáveis pela indução da resposta imune do hospedeiro (SEYFFERT *et al.*, 2011) assim como estudos para determinação de condições apropriadas para indução de resposta imune a antígenos, incluindo a definição de adjuvantes, vias de administração e protocolos de imunização, os quais são importantes no aperfeiçoamento de vacinas eficazes (ABATH *et al.*, 1998; COSTA, 2002; GRIFFIN, 2002). Ao estudar os mecanismos de virulência que patógenos utilizam para propagação em um hospedeiro não só fornece potenciais alvos para o tratamento, mas também muitas vezes fornece “*insights*” sobre as moléculas do hospedeiro afetadas.

Neste contexto, este estudo objetivou avaliar a resposta imune de camundongo infectados por *C. pseudotuberculosis* virulenta ER1409 e estimulados por proteínas recombinantes, rPLD, rCP40 rPKnG rCP5582 (G04), rCP7041 (G10) desta bactéria.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Cultivo da linhagem bacteriana de *Corynebacterium pseudotuberculosis***

Para a realização do presente estudo foi utilizada uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*, denominada ER1409 objetivando os procedimentos relacionados com a infecção dos animais e à cultura celular. Esta estirpe foi recentemente isolada de um caprino naturalmente infectado da Fazenda Experimental da UFBA localizada na região de Entre Rios-BA, e doado ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA) no ano 2016. A identificação prévia da linhagem foi realizada pelo método de Gram, cultura de *Corynebacterium spp*, hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* (Egen *et al.*, 1988) e análises bioquímicas (API Coryne Biomérieux, SA, Marcy-I'Etoile França), sendo realizada adicionalmente a sorologia para Linfadenite Caseosa.

Para a produção das proteínas secretadas, seguindo-se protocolo estabelecido por Paule *et al.* (2003), utilizaram-se quatro litros de cultura da ER1409 em meio de infusão de cérebro e coração - BHI - (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) cultivados a 37°C, por 48 horas. Resumidamente, o cultivo foi centrifugado a 10.000xg por 15 minutos, seguido de filtração em membrana de diálise durapore em PVDF de 0,45µm (Millipore, Indústria e Comércio LTDA, São Paulo-SP), com o intuito de eliminar as bactérias presentes no meio. Em seguida, o sobrenadante foi fracionado em um procedimento composto por três fases (“Three Phase Partitioning” - TPP). Primeiro ocorreu à saturação com 30% de sulfato de amônia (VETEC Química Final LTDA – Rio de Janeiro-RJ) a temperatura ambiente, sob leve agitação, em seguida o pH foi ajustado para 4,0, e acrescentado o n-Butanol (VETEC Química Final LTDA – Rio de Janeiro-RJ) na mesma proporção do volume do meio de cultura BHI (04L), seguido de uma agitação vigorosa durante um minuto. Este material então foi mantido em repouso durante uma hora, para promover a precipitação protéica. O precipitado foi coletado, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, e novamente centrifugado a 1350xg durante 10min. e a interface foi coletada e dissolvida em 05 ml de tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Este material foi então submetido à diálise contra Salina Tamponada com Fosfato - PBS, pH 7,2, realizada em três banhos de 08 horas a 4°C. Para a determinação protéica foi empregado o método de Lowry (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Califórnia-USA). As amostras, antes de serem armazenadas a – 20°C, foram acondicionadas em um saco contendo gelo, e foram submetidas à esterilização por exposição à luz ultravioleta durante 15

min. Este antígeno foi utilizado para realização do ELISA indireto para as dosagens de imunoglobulinas da classe IgG e as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3.

Para proceder à infecção dos animais testados, foi realizada a quantificação bacteriana, seguindo o protocolo de Pedral (2012). Resumidamente, foram retirados 05 mL dos 250ml de uma cultura mantida por 48h a 37°C. Este material foi lavado duas vezes, em solução salina, através de centrifugações de 04 min. a 8.000xg. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescido o SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e incubou-se por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Logo após foi realizada uma nova lavagem para a remoção dos reagentes e o *pellet* bacteriano foi ressuspensão e mensurado no citômetro de fluxo. Para isso, foram utilizados tubos TruCount (Becton Dickson, EUA), contendo *pellet* de microesferas fluorescentes, com a quantidade de *beads* constantes em cada lote. A concentração bacteriana foi estabelecida seguindo o seguinte cálculo: Bactérias totais =  $(N^{\circ}beads \text{ eventos bactérias} / N^{\circ} \text{ de } beads \text{ A+B}) \times N^{\circ} \text{ de } Beads \text{ por } \mu\text{l}$ .

## **Animais**

Na realização dos experimentos foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, doados pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Escola de Medicina Veterinária (Biotério) - Universidade Federal da Bahia (MEV-UFBA): Salvador - BA com idade aproximada de 6 a 8 semanas, de ambos os sexos.

Os animais foram alojados em caixas de criação com 30x19,5x12 cm, quatro a seis animais por caixa, durante todo o período do experimento, no Biotério do Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA), sob condições adequadas de temperatura ( $21 \pm 1^{\circ} \text{ C}$ ) e de umidade (50 - 60 %), luminosidade e livres de patógenos. Estes foram alimentados com ração balanceada, sendo mantidos com alimentação e água *ad libitum*.

A utilização do modelo murino deu-se devido à escassez de reagentes específicos para dosar biomoléculas relacionadas com a imunorregulação em pequenos ruminantes, principais hospedeiros naturais de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, além da infecção experimental de camundongos reproduzirem os principais aspectos observados em caprinos e ovinos. A linhagem utilizada apresenta uma doença moderada, quando comparada, por exemplo, com aquela desenvolvida por camundongos de outras linhagens.

Este estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, sob o protocolo nº 106/2016.

## **Obtenção das Proteínas Recombinantes, linhagens bacterianas e condições de cultivo**

As proteínas recombinantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, aqui utilizadas, rPLD, rCP40 rPKnG rCP5582 (G04), rCP7041 (G10) foram expressas e purificadas seguindo protocolos experimentais padronizados pelo Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas da UFPel, Laboratório de Genética Celular e Molecular da UFMG e Departamento de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde UFBA, sendo então cedidas para o uso neste estudo.

Como linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho tem-se *C. pseudotuberculosis* 1002, *Escherichia coli* TOP10 e *E.coli* BL21 Star, cedidas pelo Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas da UFPel. *C. pseudotuberculosis* 1002 foi cultivada em meio “Brain Heart Infusion” (BHI) suplementado com Tween 80 a 0,5 %, por 72 h a 37°C sob agitação. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) ou LB-Ágar por 16h a 37°C, acrescido, quando necessário, de 100 µg/mL de ampicilina.

## **Infecção Experimental**

Foram utilizados 12 camundongos, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Escola de Medicina Veterinária (Biotério) - Universidade Federal da Bahia (UFBA): Salvador - BA com idade aproximada de 6 a 8 semanas, de ambos os sexos. O protocolo experimental foi delineado com a infecção de 06 animais com  $10^2$  CFU da cepa virulenta ER1409 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, injetadas por via intraperitoneal, sendo também injetada solução salina sob as mesmas condições 06 animais do grupo controle. A determinação da dose utilizada para a promoção da infecção,  $1 \times 10^2$  de ER1409 foi estabelecida com o objetivo de promover o desenvolvimento de uma patologia crônica, entretanto sem ocasionar mortalidade nos animais. No tempo 0 e 30 dias após a infecção experimental, foi coletado sangue para acompanhamento sorológico destes animais e análise da produção de imunoglobulina G, e 06 camundongos foram eutanasiados em cada tempo para o cultivo de esplenócitos sob estímulo das proteínas recombinantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. No decorrer do experimento foi feito o acompanhamento da evolução da doença e coleta de material para acompanhamento da resposta imunológica.

## Ensaio com células esplênicas

### *Obtenção dos linfócitos*

Nos tempos 0 e 30 dias os animais eutanasiados de ambos os grupos controle e infectados respectivamente tiveram os baços retirados assepticamente e lavados duas vezes em Meio RPMI 1640 (Sigma). As células esplênicas foram coletadas por diluição em meio RPMI (3mL) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. Em seguida as células obtidas foram diluídas 1:100 (30µl de ácido acético, 960 µl de PBS e 10 µl de célula) e contadas em contador automático de células.

### *Cultivo dos linfócitos*

As células esplênicas foram cultivadas em placas de 24 poços numa concentração de  $10^6$ /mL. Foram adicionados à placa os antígenos recombinantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582-G04, rCP7041-G10) em uma concentração de 10µg por poço, com 1000uL (meio de cultura + células). Posteriormente estas células foram incubadas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37° C por 48 horas. Após este período de incubação o conteúdo dos poços foi coletado, centrifugado e o sobrenadante armazenado a -20° C para posteriores dosagens. O pelet foi lavado para avaliação por citometria de fluxo da expressão dos marcadores CD3/CD4+, CD3/CD8+ e FOXP3.

### **Dosagem de Imunoglobulinas**

Foi acompanhada a produção de IgG total e subclasses (IgG1, IgG2a e IgG2b e IgG3) nos camundongos durante 30 dias de infecção por *C. pseudotuberculosis*, através do ELISA indireto padronizado no Laboratório de imunologia e biologia molecular no Instituto de Ciências da Saúde da UFBA descrito a seguir:

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1µg de antígeno secretado (BHI ER1409) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (100µL por poço) e incubadas *overnight* à 4°C. Após este período as placas foram lavadas duas vezes com PBS-T 0,05% (tampão de lavagem utilizado em todas as etapas). Após incubação *overnight* as placas foram bloqueadas com 200µL de leite desnatado a 5% por 2 horas a 37°C. Depois do bloqueio as placas foram lavadas uma vez e a seguir plaqueou-se 50µL de soro dos animais diluído em PBS-T contendo

leite desnatado a 1% (1:50-IgG total). As placas foram então incubadas por 1 hora a 37°C. Passado tempo de incubação, foram feitas cinco lavagens com PBS-T 0,05% e acrescentados 50 µl de conjugado, que consistiu em IgG de cabra conjugada com peroxidase, anti-IgG total ou contra cada subclasse (anti-IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) diluído 1: 5.000 em PBS-T 0,05%, leite desnatado 1%, incubou-se por 45 minutos a 37°C. Logo depois foram feitas cinco lavagens, e adicionou-se 50µL da solução reveladora TMB, incubando por um tempo médio de 15 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Por fim a reação foi interrompida com 25µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4N e a leitura foi feita em fotocolorímetro com filtro de 450 a 620nm.

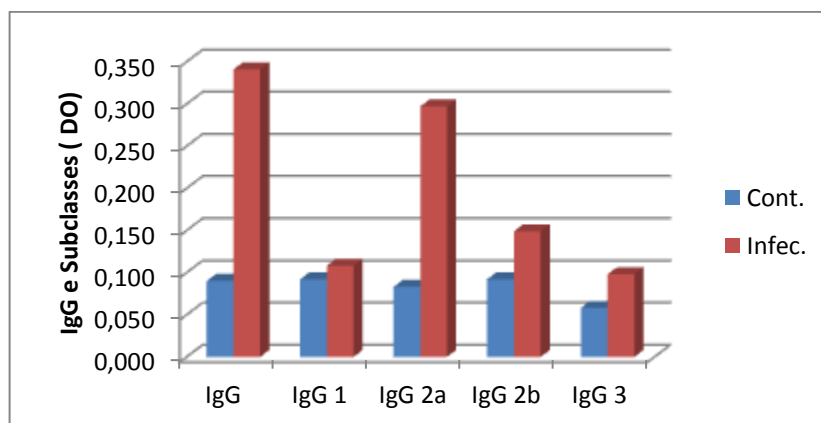
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta imune contra *C. pseudotuberculosis* tem um componente humoral bem conhecido e envolve um mecanismo celular complexo contra antígenos bacterianos somáticos e secretados (VALE *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2014) . Além disso, a resposta imune celular é outra maneira de reduzir a disseminação do patógeno, o que pode sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos (PÉPIN *et al.*, 1997; LAN *et al.*, 1998; MCKEAN *et al.*, 2005; VALE *et al.*, 2016)

### **Produção de IgG total e suas subclasses pelos camundongos *Swiss* ao longo da infecção.**

Para avaliação da resposta imune humoral, a produção de anticorpos específicos IgG foi realizada através do ensaio imunoenzimático ELISA utilizando o soro, 30 dias de infecção experimental dos camundongos por *C. pseudotuberculosis*.

A *figura 05* demonstra a produção de IgG total e as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 por camundongos *Swiss* infectados com 10<sup>2</sup> CFU da linhagem virulenta ER1409 de *C. pseudotuberculosis*, nos tempos zero (correspondente a soros de camundongos *Swiss* sadios), 30 dias através da técnica de ELISA indireto, com a placa de poliestireno sendo sensibilizada com o antígeno BHI ER1409.



**Figura 5:** Avaliação de IgG total e suas subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em camundongos 30 dias após infecção com a linhagem virulenta ER1409. Controle: tempo zero. ELISA Indireto.

Ao analisar a produção de IgG e suas subclasses com 30 dias de infecção, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os animais infectados e controles nos níveis de IgG total ( $p < 0,001$ ), IgG2a ( $p < 0,001$ ), IgG2b ( $p < 0,001$ ) e IgG3 ( $p < 0,001$ ). Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IgG1 ( $< 0,46$ ), quando comparados os grupos de animais controle e infectados. Os resultados do grupo controle representam as leituras das densidades ópticas (DO) médias obtidas a partir de seis animais antes da infecção.

As subclasses de IgG em maiores níveis de DO. com 30 dias de infecção foram IgG2a e IgG2b. Considerando que *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular que produz fosfolipase D, uma exotoxina com propriedades altamente imunogênicas, a produção de imunoglobulinas específicas é crucial para neutralizar a fosfolipase D (EGGLETON, *et. al.*, 1991; HODGSON, *et. al.*, 1994; VALE, *et. al.*, 2016)

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 30 dias de infecção, entretanto, Vale *et al.* (2003, 2016), observaram menor produção de anticorpos com 30 dias de infecção quando comparados com outros tempos. A linhagem ER1409 foi capaz de induzir níveis significativos de IgG e IgG2a, caracterizando uma resposta imune do tipo Th1, envolvida na eliminação de patógenos intracelulares, como *C. pseudotuberculosis* (DORELLA, 2009).

A resposta humoral encontrada na infecção com a linhagem virulenta ER1409 apresentou similaridades à observada por Vale (2005) na infecção experimental com a



linhagem atenuada T1, onde se verificou aumento na produção de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b com trinta dias de infecção, sendo que a produção de IgG2a aumentou ao longo do tempo. Todavia, as diferenças das respostas imunes, celular e humoral existentes entre esses estudos se devem, provavelmente, às diferentes linhagens bacterianas utilizadas na infecção.

Quando estimuladas, as células Th1 produzem, dentre outras citocinas, o IFN- $\gamma$ , a IL-2 e o TNF- $\gamma$ , as quais promovem mecanismos efetores celulares da resposta imune, incluindo hipersensibilidade tardia, reações inflamatórias e, no camundongo, a produção de anticorpos da classe IgG2a, os quais são capazes de favorecer, direta ou indiretamente, a opsonização e toxicidade mediada por células. Tais mecanismos efetores são direcionados ao combate a patógenos intracelulares. (COFFMAN, 2006; FRAGA, 2012)

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).

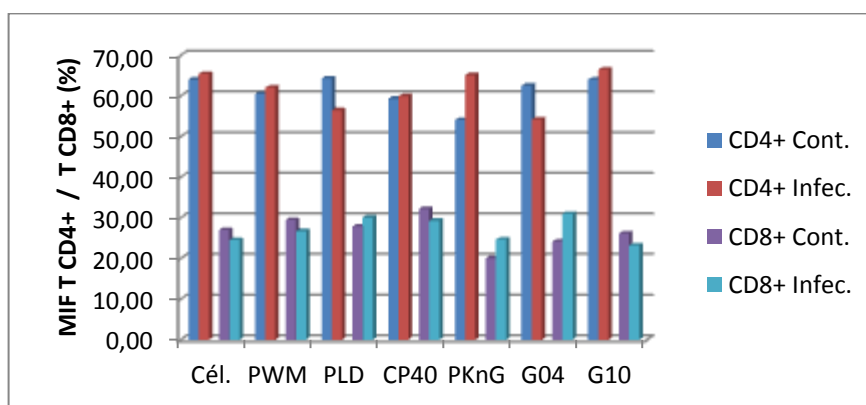
O IFN- $\gamma$  também atua em linfócitos B para diminuir a produção de IgG1 e aumentar a produção de IgG2a em camundongos. IgG2a pode ativar o sistema complemento e também atuar na opsonização da bactéria, para facilitar a fagocitose pelos macrófagos (GALVÃO, 2015). Essa imunoglobulina é importante no combate a bactérias como *C. pseudotuberculosis*, pois ela possui uma alta capacidade de responder a polissacarídeos, que estão presentes em grande quantidade na parede celular de bactérias Gram-positivas (BARRETT, 1986; VAZQUEZ *et. al.*, 2015). Relata-se que a produção de IgG2a está relacionada com a presença de IFN- $\gamma$  durante a infecção, em camundongos (GALVÃO, 2015).

Existe ainda outra via de modulação da resposta imune, contra esse tipo de bactéria, a partir da diferenciação de T CD4<sup>+</sup> em célula Th2 em resposta ao estímulo por IL-4 (VAZQUEZ *et. al.*, 2015). Elas são capazes de produzir IL-10 que estimulam também a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos para produzirem IgG, favorecendo assim o desenvolvimento da resposta humoral. A presença de IL-10 também pode resultar no bloqueio da ativação de macrófagos, a partir do impedimento da atuação do IFN- $\gamma$ . Por isso IL-10 é conhecida como citocina imunorregulatória. Em suma, Th1 modula a resposta celular e Th2 a

resposta humoral (DE WAAL MALEFYT *et. al.*, 1991; ZOUAIN *et.al.*, 2001; VAZQUEZ *et al.*, 2015).

### Avaliação da expressão de células T CD3/CD4+, células T CD3/CD8+ e FOXP3 sob estímulo de antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis*.

As médias de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão das células T CD3/CD4+ e CD3/CD8+ são demonstradas na figura 06, onde, para o MIF de CD4+ não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (infecção e controle) para qualquer um dos antígenos recombinantes testados. No entanto, observou-se que houve diferença entre os grupos (controle e infecção) para o MIF de CD8 apenas quando o antígeno G04 (rCP5582) foi usado como estímulo ( $p=0,011$ ). Vale ressaltar que sob o estímulo da proteína PKnG houve um aumento na expressão de CD4 nos animais infectados, porém sem diferença estatisticamente significativa.



**Figura 6:** Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4+ e T CD8+ em camundongos *Swiss* controles e 30 dias de infecção, estimulados com os antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582 (G04), rCP7041 (G10). Células (Cél): controle sem estímulo. Pokeweed (PWM): Mitógeno – controle positivo.

A resposta imune esperada contra patógenos intracelulares facultativos envolvem as células T CD4+, da subpopulação Th1, com a produção principalmente de IFN- $\gamma$  e ativação de células fagocíticas; enquanto que os linfócitos T CD8+ estão envolvidos tanto na produção de mais INF- $\gamma$ , como também na identificação e eliminação de células infectadas (BRANDÃO *et.al.*, 2012; LAN *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 2004; MATHURIN *et. al.*, 2009; MURPHY *et. al.*, 2001; ZHAN & CHEERS, 1993). Neste sentido, a avaliação da proporção de células TCD4+ e T CD8+, através da imunofenotipagem, torna-se um valioso instrumento.

Desta forma, foi observada uma constância na intensidade de fluorescência das células T CD4<sup>+</sup> nos animais *Swiss* estimuladas com os diferentes antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis*, ao passo que de maneira geral, observa-se valores mais elevados na intensidade de fluorescência das células T CD4<sup>+</sup> quando comparado a T CD8<sup>+</sup>, com 30 dias de infecção.

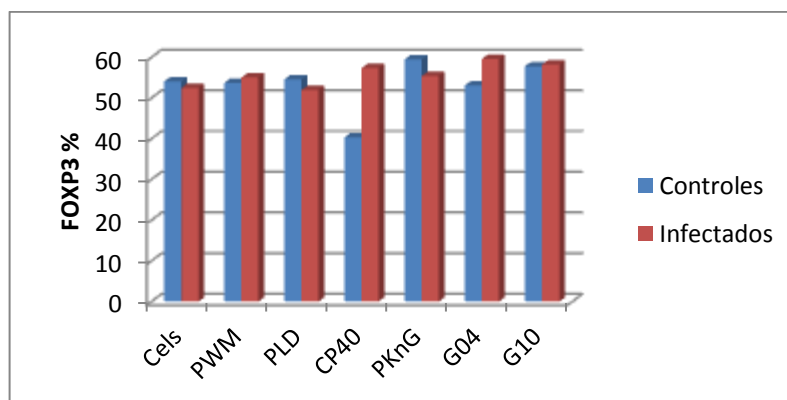
Outros estudos vêm mostrando que o envolvimento da resposta celular, mais especificamente, da indução de uma resposta Th1, é a mais satisfatória na resistência contra bactérias intracelulares facultativas uma vez que auxilia o mecanismo de fagocitose e destruição destes patógenos (KAUFMANN, 1993), entretanto, o desenvolvimento de um perfil Th2 também é necessário, principalmente por atuar na formação de granulomas e, no caso desta enfermidade, na formação de anticorpos que neutralizam a exotoxina de *Cp* (FRAGA, 2012).

Dados de Lan e colaboradores, 1999, sugerem que as células T CD4, provavelmente as células T Th1, desempenham um papel importante na imunidade contra infecção secundária por *C. pseudotuberculosis* (BASTOS, *et. al.*, 2012).

Quando peptídeos são apresentados via MHC de classe II às células T CD4<sup>+</sup>, as mesmas podem se diferenciar em células Th1 ou Th2. Quando se diferenciam em Th1, essas produzem IFN- $\gamma$ , que desencadeia a ativação da resposta imune celular (VAZQUEZ, *et. al.*, 2015).

Em camundongos Balb/c, vacinados contra *Staphylococcus aureus*, com uma vacina multivalente, foi observado que a baixos níveis de IgG a atuação de células T CD4<sup>+</sup> foi eficiente para promover a proteção contra *S. aureus* e aumentar o tempo de sobrevivência de alguns animais (MONACI, *et. al.*, 2015). A subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> estaria relacionada com a atividade efetora e citotóxica, podendo atuar como um mecanismo de proteção antibacteriana para conter a disseminação de macrófagos infectados por *C. pseudotuberculosis*. A função destas células estaria baseada na capacidade de produzir IFN- $\gamma$  e promover a lise de células infectadas (CARMINATI, 2005; LAN *et al.*, 1998).

Observou-se que na figura 07 não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de FOXP3 entre os grupos (controle e infecção) em nenhum dos estímulos/inibidores utilizados. Entretanto, em animais infectados e estimulados com a proteína Cp40 ocorreu maior expressão de FOXP3 dos animais infectados quando comparado ao controle.



**Figura 7:** Níveis de FOXP3 em células esplênicas murinas sob estímulo dos antígenos recombinantes de *C. pseudotuberculosis* rPLD, rCP40, rPKnG, rCP5582 (G04), rCP7041 (G10). Controle: tempo zero. Infectados: 30 dias.

As células T regulatórias (Treg), que representam 5% a 10% das células T periféricas, regulam as atividades dos subconjuntos de células T através da realização de funções imunossupressoras e, assim, impedem o desenvolvimento de respostas auto-imunes. A maioria das células Treg são CD4 +, CD25 + e FOXP3 + (MARZANO *et al.*, 2009).

Os linfócitos T regulatórios (Tregs) que expressam FOXP3 estão envolvidos na atenuação benéfica da imunopatologia, mas também estão relacionados à redução da regulação das respostas protetoras à infecção (BURL, *et al.*, 2017). Assim, as células que expressam FOXP3 estão envolvidas na limitação da imunopatologia, e surgiu posteriormente que várias doenças inflamatórias crônicas em seres humanos podem ser acompanhadas por função Treg reduzida (CHATILA, *et al.*, 2005). Este papel antiinflamatório benéfico também é visto em vários modelos de doenças infecciosas (JI, *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm demonstrado que a principal fonte de IL-10 pode ser as células T que também produzem IFN- $\gamma$ , 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; RODRIGUES, 2015).

Um estudo recente revelou que o FOXP3 está presente em um nível mais alto no sangue periférico de pacientes com tuberculose do que no sangue dos controles (GUYOT-ROVOL *e. al.*, 2005). Da mesma forma, a expressão de FOXP3 foi aumentada no local da doença e a remoção das células CD25 alta causou algum aumento na resposta linfoproliferativa a antígenos de *M. tuberculosis in vitro* (GUYOT-ROVOL *et al.*, 2005). No entanto, este estudo não determina se os Tregs FOXP3 + prejudicam as respostas efetoras benéficas ou limitam as imunopatologias.

Vale ressaltar que a linfadenite caseosa é uma doença infecto contagiosa de caráter crônico e que os resultados aqui apresentados, são resultados com apenas 30 dias de infecção. Vale *et al.*, 2016, avaliando a produção de anticorpos, óxido nítrico e citocinas durante 120 dias de infecção em camundongos, obteve diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os tempos. Portanto ampliando o tempo de infecção poderemos ter resultados diferentes do encontrado para 30 dias.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que *C. pseudotuberculosis* frequentemente estabelece infecções persistentes que podem ser facilitadas por mecanismos que reduzem a imunidade.

O fato de este ser um patógeno intracelular, e a imunopatogênese está caracterizada pela formação de granulomas, biologicamente isso representa uma forma de contenção do bacilo nos tecidos do hospedeiro. Assim, dados relatados sugerem que os anticorpos podem ajudar a proteger os animais contra a infecção, mas a proteção mais efetiva deve proporcionar uma melhor estimulação de imunidade celular, como a ativação das Células CD8+ bem como a secreção de IFN- $\gamma$ , para controlar a disseminação da bactéria em uma fase inicial do processo infeccioso. Desta forma, os mecanismos moleculares envolvidos na infecção por *C. pseudotuberculosis* ainda precisam ser melhor compreendidos para que a estimulação específica das respostas imunes celulares possam ser realizadas através da imunização.

Embora os achados sobre a resposta imune gerada nos camundongos deste estudo não tenham sido conclusivos, estes podem ser extrapolados para outros modelos experimentais mais abrangentes em busca de resultados mais completos que contemplem tanto a resposta imune inata quanto adaptativa.

Contudo, estes resultados contribuem para uma melhor análise e compreensão do tipo de resposta, e dos mecanismos imunológicos envolvidos durante infecção com uma nova estirpe selvagem de *C.pseudotuberculosis* em camundongos *Swiss*, com isso, contribuindo para o conhecimento de vias de suma importância para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficientes frente a este bacilo.

## REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G.; MONTENEGRO, S. M. GOMES, Y. M. Vaccines against human parasitic diseases: an overview. **Acta Trop.**, [S.l.], v.71, n.3, p.237-54, 1998.
- ABBAS, A.K.; LINCHTMAN, A.H.; PROBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 8ª ed. São Paulo: *Elsevier*, 2015.
- AL-GAABARY, M. H.; OSMAN, S. A.; OREIBY, A. F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research**, [S.l.], v. 87, p.116-121, 2009.
- AL-RAWASHDEH O.F., AL-QUDAH K.M., Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan, *J. Vet. Med.B Infect.Dis.* **Vet.Public Health**. v.47 287–293. 2000.
- ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa: O estado da arte. Sobral: **Embrapa caprinos**, v.74, p. 1-57, 2007.
- ANDERSON, M.; NAIRN, M. E. Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. **Colloques de LINRA**, [S.l.], v. 28, p. 605-609, 1984.
- ARSENAULT J., GIRARD C., DUBREUIL P., DAIGNAULT D., GALARNEAU J.-R., BOISCLAIR J., SIMARD C., BÉLANGER D., Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, **Prev.Vet. Med.** v.59. 67–81. 2003.
- ATON, M. W. et al. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. **Aust. Vet. J.**, [S.l.], v. 71, p. 47–49, 1994.
- AUGUSTINE, J. L.; RENSHAW, H. W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. **Am. J. Vet. Res.**, [S.l.], v. 47, p. 713–715, 1986.
- AWAD, F.J. Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. I. Agglutination test. **Am. J. Vet. Res.** [S.I.], v.81, p. 251-253, 1960.
- BAIRD, G. J., FONTAINE, M. C., *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J. Comp. Path.** 137, 179-210, 2007.
- BARKSDALE, L.; LINDER, R.; SULEA, I.T. Phospholipase D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the genus *Corynebacterium*. **J. Clin. Microbiol.** v. 13, p. 335-343, 1981.
- BASTOS, B. L. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential. **Clinical & Cellular Immunology**, [S.l.], v. S4, p. 1-15, 2012.

BATEY, R.G. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. **Veterinary Microbiology**, 11(1-2): 145-152, 1986(a).

BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**, 63(9): 269-272, 1986(b).

BATTISTONI, A. et.al. Increased expression of periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase enhances survival of *Escherichia coli* invasive strains within nonphagocytic cells. **Infect. Immun.** v.68, 30–37. 2000.

BECK, B.L., TABATABAI, L.B., MAYFIELD, J.E. A protein isolated from *Brucella abortus* is a Cu–Zn superoxide dismutase. **Biochem.** v.29, 372–376. 1990.

BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, 271: C1424-37, 1996.

BEHAR SM, DIVANGAHI M, REMOLD HG: Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol* 2010, 9:668–674.

BEN SAID, M.S. et.al. Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis, **Arch.Inst. Pasteur Tunis.** v.79. 51–57. 2002.

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

BEYER, W., IMLAY, J., FRIDOVICH, I., Superoxide dismutases. **Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.** v.4, 221–253. 1991.

BIBERSTEIN, E.L.; KNIGHT, H.D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Record.** v.89: 691–692, 1971.

BILLINGTON, S. J.; ESMAY, P. A.; SONGER, J. G.; JOST, B. H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **F. Microbiol. Let.** v. 208: p.41-45, 2002.

BINNS S.H., BAIRLEY M., GREEN L.E., Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999, **Vet. Rec.** v.150 263 –268. 2002.

BINNS, S.H.; GREEN, L.E.; BAILEY, M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. **Vet Microbiol.** [S.I.], v. 123, n. 1-3, p. 169-179, 2007.

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

BOUTROS T, CHEVET E, METRAKOS P: Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. **Pharmacol Rev** v.60:261–310. 2008.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **J. Comp. Path.** v. 137: p.179-210, 2007.

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

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

BRAVERMAN, Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A., et al. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Rev. Sci. Tech. O I E** (Off Int. Epizoot) 18: 681–690, 1999.

BRITO, Ioná. Desenvolvimento de Alvos Antigênicos Recombinantes para Vacinas contra a Linfadenite Caseosa Caprina. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – RENORBIO-SE. Fundação Universidade Federal de Sergipe, 2016.

BROGDEN, K.A. et al. The effect of mummy dipeptide on the immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole cell vaccines in mice and lambs. **Am. J.Vet. Res.** [S.I.], v.51, p. 200-202, 1990.

BROWN MD, SACKS DB: Protein scaffolds in MAP kinase signalling. **Cell Signal.** v.21:462–469. 2009.

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.

BURREL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Aust. Vet. J.**, [S.l.], n. 57, p. 105110, 1980.

CAMERON, C.M.; SWART, C.F. A new liquid medium for the cultivation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of the South African Veterinary Association**, Med. Ass., 36 (2): 185188,1965.

CARGNELLO, M. AND ROUX, P.P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and molecular biology reviews.** v.75. p.50–83. 2011.

CARMINATTI, R. Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes ELISA e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de Linfadenite Caseosa em caprinos. 2005. 82f. **Dissertação de Mestrado em Imunologia.** Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

CARMINATTI, R. et al. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de Elisa indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **R. Ci. Méd. Biol.** [S.I.], v. 2, p. 88-93, 2003.

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

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



- CARTER, N.A., et.al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. **J Immunol.** May 15;186(10):5569-79. 2011.
- CHEN, Z., et al. MAP kinases. **Chem. Rev.** **101**:2449–2476. 2001.
- CHIKHAOUI, M.; KHOUDJA, F. B. Clinicopathological investigation on caseous lymphadenitis in local breed sheep in Algeria. **Tropical animal health and production**, [S.l.], v. 45, p. 1641-3. 2013.
- CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuelan goat flocks. **Small Ruminant Research**, [S.l.], v. 65, p. 170-175. 2006.
- COFFMAN, R. L. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. **Nat Immunol** 7(6): 539-41. 2006.
- COLE ST, et. al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature.** v.393:537–544. 1998.
- COMFORT, D., CLUBB, R.T. A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in gram-positive bacteria. **Infect Immun.** v.72:2710–2722. 2004.
- CONLAN JW, NORTH RJ. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. **J Exp Med.** Sep 1;174(3):741-4,1991.
- CONNOR K.M., QUIRIE M.M., BAIRD G.,DONACHIE W., Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis, **J.Clin. Microbiol.** v.38. 2633–2637. 2000.
- CONNOR, K.M.; FONTAINE, M.C.; RUDGE, K., et al. Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Research** 38: 613–623, 2007.
- COSTA, L.F.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the ethiological agent of the caseous lymphadenitis in goats. **R. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 1, n. 1, p. 105-115,nov. 2002.
- COSTA, L.R.R.; SPIER, S.J.; HIRSH, D.C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin, **Veterinary Microbiology**, 62: 135–143, 1998.
- COSTA, M. P. et al. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. **BMC Research Notes**, [S.l.], v. 4, p. 243, 2011.
- COTTREZ, F.; HURST, S. D.; COFFMAN, R. L.; GROUX, H. T regulatory cells 1 inhibit a h2-specific response in vivo. **J. Immunol.** 165: 4848-4853, 2000.
- COULOMBE, P., AND S. MELOCHE. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1773:1376–1387. 2007.

- COWLEY S, et.al. The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. **Mol Biol.** v.52:1691–1702. 2004.
- D'AFONSECA, V. et al. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genetics and Molecular Research**, [S.l.], v. 7, p. 252-260, 2008.
- DERCKSEN DP, Brinkhof JMA, Dekker-Nooren T et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Vet Microbiol** 75: 167–175. 2000.
- DEWINTER, L.M.; BERNARD, K.A.; ROMNEY, M.G. Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(7): 3447–3449, 2005.
- DORELLA, F. A. et al. *In vivo* insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 72, p. 73687372, 2006a.
- DORELLA, F. A.. et al. Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. **Genetics and Molecular Research**, [S.l.], v. 5, p. 653663, 2006b.
- DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, [S.l.], v. 37, p. 201-218, 2006c.
- DORELLA, F.A. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Ver. Vaccines**. [S.I.], v. 8, p. 205-213, 2009.
- DRAMSI, S., TRIEU-CUOT, P., BIERNE, H. Sorting sortases: A nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. **Res Microbiol** v.156:289–297. 2005.
- DROPPA-ALMEIDA, D. **Desenvolvimento de vacina recombinante contra a Linfadenite Caseosa**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Tiradentes, Sergipe, 2013.
- DUARTE, T. A.; Avaliação do papel do Interferon- $\gamma$  na modulação da resposta tecidual contra o *Mycobacterium bovis*. Dissertação de mestrado Fio Cruz – BA, 2000.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L. M., e CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico, **JornalV Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350,2003.
- DUSSURGET, O. et.al. Role of *Mycobacterium tuberculosis* copper-zinc superoxide dismutase. **Infect Immun.** v.69:529–33. 2001.
- EGEN N.B. et.al. Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing, **Am. J. Vet. Res.** v.50. p1319–1322. 1989.

EHLERS, S.; BENINI, J.; HELD, H. D.; ROECK, C.; ALBER, G.; UHLIG, S. Alphabeta T Cell Receptor – positive cells and interferon-g, but not inducible Nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria- induced pulmonary immunopathology. **J. Exp. Med.** V. 194: p. 1847 -1859, 2001

EL SHAFEY, H.M. et al. *Corynebacterium glutamicum* superoxide dismutase is a manganese-strict non-cambialistic enzyme *in vitro*. **Microbiological Research.** v.163. 80—86. 2008.

ELLIS, J.A.et. al. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Vet.Immunol Immunopathol** 28: 303-316. 1991.

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

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

FORRELLAD MA, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence.** v.4. p.3–66. 2013.

FRAGA, R. Resposta immune de diferentes linhagens marinas à infecção experimental com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Tese de Doutorado**, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, UFBA, 2012.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. **Rev. Biochem.** v.64, 97–112. 1995.

FUNKE G, LAWSON PA AND COLLINS MD Heterogeneity within humanderived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1- like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. Nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**45: 735-739.1995.

GARG, D.N, NAIN, S.P.S. AND CHANDIRAMANI, N.K. Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats. **Indian. Vet. J.** 62:805-808. 1985.

GIL M, GRANA M, SCHOPFER FJ, WAGNER T, DENICOLA A, FREEMAN BA, et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* PknG by non-catalytic rubredoxin domain specific modification: reaction of an electrophilic nitro-fatty acid with the Fe-S center. **Free radical biology & medicine.** v.65, p.150–161. 2013.

GOODFELLOW, M. **Suprageneric classification of actinomycetes.** In: Bergey's manual of systematic bacteriology (Williams ST, Sharp ME and Holt JG, eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, 2333-2339. 1989.

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.

- GRIFFIN, J. F. A strategic approach to vaccine development: animal models, monitoring vaccine efficacy, formulation and delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, [S.l.], v.54, n.6, p.851-61, 2002.
- GUIMARÃES, A.S.; CARMO, F.B.; PAULETTI, R.B.; et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnoses and control. **The IIOAB Journal**. India. Vol. 2; pg. 33-43. 2011.
- GUIMARÃES, A.S.; GOUVEIA, A.M.G.; ABREU, A.B.; et al. Características zoossanitárias das caprinoculturas de leite e corte em Minas Gerais. **Revista de Veterinária e Zootecnia em Minas** 101: 23–29, 2009(b).
- GUIMARÃES, A.S.; SEYFFERT, N.; BASTOS, B.L.; et al. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, 87:86-91, 2009(a).
- HARD G.C., Comparative toxic effect on the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infect. Immun.** v.12, p. 4139–1449, 1975.
- HARD, G.C. Electron Microscopic Examination of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 97, n. 3, p. 1480-1485, 1969.
- HAYASHI, M., AND J. D. LEE. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. **J. Mol. Med.** 82:800–808. 2004.
- HOELZE, L. E. et al. Difference in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, [S.l.], v.164, p. 359-365, 2013.
- HOFSTRA, C. L.; VAN ARK, I.; HOFMAN, G.; KOOL, M.; NIJKAMP, F. P.; VAN
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – Pesquisa Pecuária Municipal, Sistema IBGE de Recuperação automática – SIDRA. Disponível em <[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acessado em: 19/10/2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z t&o=23&i=P>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v.41. 2013.
- JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol.Rev.**, 59(4): 533-47, 1995.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. *Imunobiologia, O sistema immune na saúde e na doença*. 2014. 8º Edição.
- JOHNSON GL, LAPADAT R: Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Sci.** v.298:1911–1912. 2002.
- JOLLY, R.D. The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. **J. Comp. Path.**, v.75, p.417-431, 1965a.

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

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Moléstias Causadas por Bactérias. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2000.

KABA, J et.al. Evaluation of the risk factors influencing the spread of caseous lymphadenitis in goat herds. **Pol J Vet Sci** 14: 231-237. 2011.

KEELE, B.B.J., MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. **J. Biol. Chem.** v.245, 6176– 6181. 1970.

KIM C, et.al. p38a MAP kinase serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. **Nat Immunol.** v.9:1019–1027. 2008.

KIM, F.J., KIM, H.P., HAH, V.C., ROE, J.H. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. **Eur. J. Biochem.** v.241, 178–185. 1996.

KIM, S., et.al. Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. **J Biochem.** v. 147: 523-533. 2010.

KRACHLER AM, WOOLERY AR, ORTH K. Manipulation of kinase signaling by bacterial pathogens. **The Journal of Cell Biology.** v.195 (7): 1083-1092. 2011.

KUBY, J. **Immunology**. W. H. Freeman and Company. 3<sup>rd</sup> ed., 1997.

KUMAR, J. et al. **Epidemiological, bacteriological and molecular studies on caseous lymphadenitis in Sirohi goats of Rajasthan**. India: Tropical Animal Health and Production, 2012.v.44.

KURIA JK, MBUTHIA PG, KANG'ETHE EK, WAHOME RG. Caseous Lymphadenitis in Goats: The Pathogenesis, Incubation Period and Serological Response after Experimental Infection. **Veterinary Research Communications.** v. 25, p. 89-97, 2001.

KYRIAKIS, J. M., AND J. AVRUCH. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol. Rev.** v.81:807–869. 2001.

LAN DT, 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. 11, p.1203-1208, 1999.

LAN DT, 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, p. 863-870, 1998.

LEARDINI N, PRIETO M, MARTINEZ C, AGUERRE L, LOAYSSA R. **Infecciones por bacilos gram positivos aeróbios, corinebactérias, bacillus Y actinomycetes**. Buenos Aires:

Curso A.N.L.I.S. “Dr Carlos Malbran”. Departamento de Bacteriologia, Serviço de Bacteriologia Especial; 2002.

LIU, D. T. et al. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Br. J. Ophthalmol.**, [S.l.], v. 89, p. 245–246, 2005.

LOUREIRO, Dan. **Soroepidemiologia da Linfadenite caseosa, da Doença da Língua Azul e da Doença de Maedi-visna em ovinos de raça definida do estado da Bahia e correlações com aspectos zootécnicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, 2012.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. RJ. v. 79 (6), p. 647- 664, 2004.

MANDLIK, A., DAS, A. and TON-THAT, H. The molecular switch that activates the cell wall anchoring step of pilus assembly in gram-positive bacteria. **PNAS**. v.105. 14147–14152 . 2008.

MARRAFFINI, L. A., DEDENT, A. C. AND SCHNEEWIND, O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.70, 192–221. 2006.

MAXIMESCU, P.; OPRISAN, A.; POP, A.; et al. Further studies on *Corynebacterium* species capable of producing diphtheria toxin (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. ovis*). **Journal of General Microbiology**, 82:49-56, 1974.

MAYER, G. Immunology - chapter one: Innate (non-specific) immunity. 2006 Disponível em:< <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter1.htm>>

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.

MELOCHE, S., AND J. POUYSSEGUR. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene** v.26:3227–3239. 2007.

MENZIES, P. I. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small Ruminant Research**, [S.l.], v.13, p. 193 – 198, 1994.

MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. The Genus *Corynebacterium*, In: Veterinary bacteriology and virology, Merchant I.A., Packer R.A. (editors), **The Iowa State University Press, Iowa**, p. 425–440. 1975.

MEYER, R. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: aspectos da prevalência, do diagnóstico e da imunidade**. Tese (Doutorado em Imunologia) no Instituto de Ciências da Saúde Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2003.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; VALE, V.; SIMONE, V.; THREZA, M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; JOSÉ A. HAGE DA, S.; MARCOS, R.; RÉGIS, LIA;

PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **R. Ci. Méd. Biol.** v. I, n. 1, p. 42-48. 2002

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSA, 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. **Vet. Immunol. Immunopathology**, v.107, n.3-4, p.249-254, 2005.

MILLS, A. E.; MITCHELL, R. D.; LIM, E.K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. **Pathology**, [S.l.], v. 29, p. 231–233. 1997.

MISHRA A, DAS A, CISAR JO, TON-THAT H. Sortase-catalyzed assembly of distinct heteromeric fimbriae in *Actinomyces naeslundii*. **J Bacteriol** v.189:3156–3165. 2007.

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.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R.L.. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, 136 (7):2348-57, 1986.

MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**; 8:958-69, 2008.

MOTOMURA Y, KITAMURA H, HIJIKATA A, MATSUNAGA Y, MATSUMOTO K, INOUE H, ATARASHI K, HORI S, WATARAI H, ZHU J, TANIGUCHI M, KUBO M. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells. **Nat Immunol.** May;12(5):450-9, 2011.

MOURA-COSTA LF, BAHIA RC, CARMINATI R, VALE VL, PAULE BJ, PORTELA RW, FREIRE SM, NASCIMENTO I, SCHAER R, BARRETO LM, 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. **Vet Immunol Immunopathol** 126: 131-141, 2008.

MOURA-COSTA, L. F. Avaliação da Resposta Imune de Caprinos da Raça Canindé a diferentes Antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Tese de Doutorado** em Programa de Pós-Graduação em Imunologia - Universidade Federal da Bahia, 2007.

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

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.

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

NADAN, D.; KNUTSON, K. L.; REINER, N. E. Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis. **J. Leukoc Biol.** v. 67: p. 464-70, 2000.

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

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

NAVAS, J. Genetic tools in pathogenic nocardioform actinomycetes. **Microbiologia** v.12: 297-304. 1996.

NIEBISCH, A., KABUS, A., SCHULTZ, C., WEIL, B., BOTT, M. Corynebacterial protein kinase G controls 2oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. **J Biol Chem.** v.281:12300–12307. 2006.

NISHIMOTO S, NISHIDA E: MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. **EMBO Rep.** v.7:782–786. 2006.

NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFD, C.M.; et al. Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology. **Wageningen Press**, Wageningen, The Netherlands. p. 445, 1997.

NOZAKI, C.N.; FARIA, M.A.R.; MACHADO, T.M.M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Arquivo do Instituto de Biologia** 67: 187–189, 2000.

NUMAZAWA S, WATABE M, NISHIMURA S, KUROSAWA M, IZUNO M, YOSHIDA T: Regulation of ERK-mediated signal transduction by p38 MAP kinase in human monocytic THP-1 cell. **J Biochem.** v.5:599–605. 2003.

O'HARE, H.M., et.al. Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. **Mol Biol.** v.70:1408–1423.6. 2008.

O'REILLY, K.M., MEDLEY, G.F., GREEN, L.E. The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, p. 115–126, 2010.

OIE – Terrestrial Manual 2008b. Disponível:

[www.oie.int/eng/normes/en\\_mmanual.htm?e1d10](http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm?e1d10) >. Acesso em: 10/02/2016. OIE. World manual health situation, 2009. Disponível em: <http:

//www.oie.int/eng/info/en\_urgences.htm>. Acesso em: 21/01/2016.

OLIVEIRA-NETO, M. **Avaliação da influência do óxido nítrico durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino.** Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2011.



OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Can. J. Vet. Res.** [S.I.], v. 66, p. 86–92, 2002.

ONO K, HAN J: The p38 signal transduction pathway: activation and function. **Cell Signal.** v.12:1–13. 2000.

ONON, E.O. Purification and Partial Characterization of the Exotoxin of *Corynebacterium ovis*. **Biochemical Journal**, 177: 181-186, 1979.

OOSTERHOUT, A. J.. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. **J. Immunol.** 161: 5054-5060, 1998.

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  $\alpha$  required as a costimulatory factor for interferon  $\gamma$ -induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 8676-8680, 1992

PACHECO, L. G. C. et al. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 2-14, 2011.

PACHECO, L. G.C. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **J. Med. Microbiology.** [S.I.] vol. 56, p. 480-486, 2007.

PATON, M. W.. et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Aust. Vet. J.**, [S.I.], v. 81, p. 91–95, 2003.

PAULE BJ, AZEVEDO V, REGIS LF, CARMINATI R, BAHIA CR, VALE VL, MOURACOSTA LF, FREIRESM, NASCIMENTO I, MEYER R. SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.** v.3, n. 1, p. 44-52, 2004.

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.; SCHAEER, R.; AZEVEDO, V. Three phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Prot. Express. Purif.** v. 34, p.311–316, 2004.

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.; SCHAEER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon production, IgG avidity and antigen recognition by Western Blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.96, p.129-139, 2003.

PEARSON, G., et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrinol. Rev.** v.22:153–183. 2001.

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

- PEEL, M. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin. Infect. Dis.**, [S.l.], v. 24, p. 185–191, 1997.
- PEKELDER, J. J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. **Diseases of Sheep**. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 270-274, 2000.
- PEPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; et al. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Veterinary Research**, 28(2): 149-163, 1997.
- PÉPIN M., PATON, M. AND HODGSON, A. L. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Current Topics in Veterinary Research**, 1, 63-82, 1994a.
- PÉPIN, M., PITTET, J. C., OLIVIER, M. AND GOHIN, I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **Journal of Leukocyte Biology**, 56, 666-670, 1994b.
- PÉPIN M, CANNELLA D, FONTAINE JJ, PITTET JC, LE PAPE A. Ovine mononuclear phagocytes in situ: identification by monoclonal antibodies and involvement in experimental pyogranulomas. **J Leukoc Biol**. Feb;51(2):188-98, 1992.
- PEREIRA, S. F. F, GOSS, L. AND DWORKIN, J. Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**. v. 75(1). P.192–212. 2011.
- PETHICK, F. E. et al. Complete genome sequences of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains 3/99-5 and 42/02-A, isolated from sheep in Scotland and Australia, respectively. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v.194, p. 4736-4737, 2012.
- PIDDINGTON, D.L. et al. Cu, Zn Superoxide Dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. Cu, Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages. **Infect Immun**. v.69:4980–7. 2001.
- PINHEIRO, R. R. et al. A. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. Revista **Portuguesa de Ciências Veterinárias**, [S.l.], v. 101, p. 51-56, 2006.
- PINTO, A. C. et al. The core stimulon of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002 identified using ab initio methodologies. **Integrative Biology**, [S.l.], v. 4, p. 789-794, 2012.
- PIONTKOWSKI, M. D.; SHIVVERS, D. W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, [S.l.], v. 212, p. 1765–1768, 1998.
- POWRIE, F.; MENON, S.; COFFMAN, R. L.. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. **Eur. J. Immun.**, 23: 2223-2229, 1993.
- 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**, 88: 287–297, 2002.

PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1<sup>st</sup> edn Roca, São Paulo. 2004.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; et al. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: Clinical Veterinary Microbiology, **Wolfe Publishing Company**, London, p.137-143, 1994.

RADOSTITS O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas por Bactérias. In: **Clínica veterinária – Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p.653-656. 2002.

REBOUÇAS, M.F.; PORTELA, R.W.; LIMA, D.D.; et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 23(2): 213-220, 2011.

REINOUT, VAN CREVEL, TOM H. M. OTTENHOFF, AND JOS W. M. VAN DER MEER. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Netherlands**. Vol. 15, No. 2, 2002.

RIBEIRO, M. G. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnostico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arq. Inst. Biol.**, [S.l.], v. 68, p. 23-28, 2001.

ROGERS, H.W., UNANUE ER. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. **Infect Immun**. Dec;61(12):5090-6, 1993.

ROGERS, E.A., DAS, A., TON-THAT, H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. **Adv Exp Med Biol**. v.715:91–103. 2011.

RUIZ, J. C. et al. Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. **Plos One**, [S.l.], v. 6, e18551, 2011.

SÁ, M. C. A. et al. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, [S.l.], v. 36, p. 265-268, 2013.

SANTANA-JORGE, K. T. O. et. al. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microb Cell Fact**. v. 15. P.83. 2016.

SANTHI, N, AISHWARYA S. Insights from the molecular docking of withanolide derivatives to the target protein PKnG from *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioinformation**. v.7 (1). p.1-4. 2011.

SAUER, F.G., et. al. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. **Curr Opin Microbiol** v.3: 65–72. 2000.

SCHERR, N., et.al. Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 104:12151–12156. 2007.

SCHUMAN W. Thermosensors in eubacteria: role and evolution. **Journal of Biosciences**, [S.l.], v. 32, p. 549-557, 2007.

SCOTT, P.R. The Skin. In: SCOTT, P.R. **Sheep Medicine**. London: Mason Pub, p. 246-248, 2007.

SEYFFERT, N. A. et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins based ELISA. **Research in Veterinary Science**. v.88.p.50–55, 2010.

SEYFFERT, NÚBIA et.al. Serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of Integrated OMICS*, Vol 1, Nº. 2. 2011.

SHADNEZHAD, A; NAEGELI, A. and COLLIN, M. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. **BMC Microbiol.** v.16: p.261. 2016

SILVA, A. et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 193, p. 323-324, 2011.

SILVA, C.L., BONATO, V.L; LIMA, K.M; COELHO-CASTELO; A.A, FACCIOLI; L.H, SARTORI A; DE SOUZA, A.O; LEÃO, S.C. Cytotoxic T cells and mycobacteria. **Microb Letters**. v.197:11–18. 2001.

SILVA, G. et.al. Desulfovibrio gigas neelaredoxin: a novel superoxide dismutase integrated in a putative oxygen sensory operon of an anaerobe. **Eur. J. Biochem.** v.259, 235–243. 1999.

SILVA, J. W. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, [S.l.], v. 10, 2014.

SILVA, M.C. Avaliação do efeito in vitro de frações de antígeno somático de *Corynebacterium pseudotuberculosis* sobre esplenócitos de camundongos da linhagem CBA. **Dissertação de Mestrado** em Imunologia, Universidade Federal da Bahia. 2010.

SILVA, W.M. et al. Differential exoproteome analysis of two *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar *ovis* strains isolated from goat (1002) and sheep (C231). **Current Microbiology**, [S.l.], v. 67, p. 460-465, 2013a.

SILVA, W.M. et al. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. **Microbial Pathogenesis**, [S.l.], v. 61, p. 37-42, 2013b.

SIMMONS, C. P., HODGSON, A. L., STRUGNELL, R. A., Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infect. Immun.** v.65(8), 3048-3056, 1997

SJÖSTEDT A, CONLAN JW, NORTH RJ. Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice and participate in defense against reinfection. **Infect Immun.** Jul;62(7):2779-83, 1994.

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

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

SOARES, S. C. et al. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi strain 258 and prediction of antigenic targets to improve biotechnological vaccine production. *Journal of Biotechnology*, [S.l.], v. 167, p. 135-141, 2013.

SON Y, CHEONG Y, KIM N, CHUNG H, KANG DG, PAE H: Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways? *J Signal Transduct*. 2011.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 156-160, 1997.

SONGER, J. G. et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, [S.l.], n. 49, v. 2, p. 223-226, 1988.

SOUZA, A. P. Estudo de aspectos da resposta imune em camundongos CBA infectados com as cepas T1 e VD57 de *Corynebacterium Pseudotuberculosis*. 2009. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Imunologia - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SOUZA, A.P., VALE V.L.C, SILVA M.C, ARAÚJO I.B.O, TRINDADE S.C, MOURA-COSTA L.F, et al. MAPK involvement in cytokine production in response to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *BMC Microbiol*. v.14:230. 2014.

SOUZA, C.D., EVANSON OA, WEISS DJ: Role of the mitogen-activated protein kinase pathway in the differential response of bovine monocytes to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and *Mycobacterium avium* subsp. avium. *Microbes Infect* 2007, 9:1545–1552.

SUTHERLAND, S.S.; HART, R.A.; BULLER, N.B. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. *Veterinary Microbiology*, 49: 1–9, 1996.

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

TELFORD, J.L, et.al. Pili in Gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol*. v.4:509–519. 2006.

THANASSI DG, HULTGREN SJ. Assembly of complex organelles: Pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system. *Methods*. v.20:111–126. 2000.

TON-THAT H, SCHNEEWIND O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* v.50:1429–1438. 2003.

TON-THAT, H., AND O. SCHNEEWIND. Assembly of pili in Gram-positive bacteria. **Trends Microbiol.** v.12:228–234. 2004.

TOUATI, D. Superoxide dismutases in bacteria and pathogen protests. In: Scandalios, J.G. (Ed.), Oxidative stress and the molecular biology of antioxidante defenses. **Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY**, p. 447–493. 1997.

TROST, E, et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. **BMC Genom.** v11. p.728. 2010.

VALDÍVIA, J. et al. Interaction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with ovine cells *in vitro*. **Veterinary Pathology**, [S.l.], v. 50, p. 318-323, 2013.

VALE, V. L. C. et.al. Humoral and cellular immune responses in mice against secreted and somatic antigens from a *Corynebacterium pseudotuberculosis* attenuated strain: Immune response against a *C. pseudotuberculosis* strain. **BMC Veterinary Research.** v.12:195. 2016.

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

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M. *et al.* Reconhecimento de antígenos por anticorpos e caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, 2003.

VALE, V. L. C.; RIBEIRO, M.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; PAULE, B.; REGIS, L.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S.; MEYER, R. Reconhecimento de Antígeno por Caprinos Naturalmente Infectados e Imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências da Saúde-UFBA, 2000.

WALBURGER, A. et.al. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. **Science.** v.304:1800–1804. 2004.

WALKER, J. et al. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and Immunity**, [S.l.], v. 62, p. 2562-2567, 1994.

WARNER, D.F., MIZRAHI V. The survival kit of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat Med.** V. 13:282–4.2007.

WEST, D.M.; BRUERE, A.N.; RIDLER, A.L. Caseous lymphadenitis. In: The Sheep: Health, Disease and Production. Foundation for Veterinary Continuing Education. Massey University, New Zealand, 2002.

WIDMANN, C., S. GIBSON, M. B. JARPE, AND G. L. JOHNSON. Mitogen activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol. Rev.** 79:143–180. 1999.

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

- WILSON, M. J.; BRANDON, M. R.; WALKER, J. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection and Immunity**, [S.l.], v.63, p. 206-211, 1995.
- WOOLDRIDGE, K. et al. Bacterial secreted proteins secretory mechanisms and role in pathogenics, 2009.
- WU, C.H. et.al. Identification and subcellular localization of a novel Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEBS Lett.** v.439, 192–196. 1998.
- WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. **Nature** v. 4, 2004.
- YOST, F.J.J., FRIDOVICH, I. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 248, 4905–4908. 1973.
- YOZWIAK, M. L.; SONGER, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic response of ovine neutrophils. **Am. J. Res.** v. 54: p. 392-397, 1993.
- ZHANG W, LIU HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Res.** 12:9–18, 2002.



Universidade Federal da Bahia  
 Instituto de Ciências da Saúde (ICS)  
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do papel das vias ERK 1/2, MAPK p38 e JAK 1, 2 e 3 na expressão de citocinas induzidas por antígenos recombinantes de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em células esplênicas de camundongos infectados", registrada com o nº 106/2016, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 16/09/2016.

Finalidade	( ) Ensino      ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2016 - 31/12/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> (camundongo heterogênico)/Swiss
Número de animais	42
Peso/Idade	25-50g/ 6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Centro de Criação de Animais de Laboratório da Escola de Medicina Veterinária da UFBA

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS  
 Profa. Tânia Tavares Rodrigues  
 Coordenadora da CEUA-ICS  
 Instituto de Ciências da Saúde - UFBA