



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Avaliação da resposta imune em ovinos co-infectados com  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus***

**Gabriele Costa Rodrigues Diz**

Salvador – Bahia  
2015



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Universidade Federal da Bahia

**Avaliação da resposta imune em ovinos co-infectados com  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus***

**Gabriele Costa Rodrigues Diz**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

**Orientador: Roberto Meyer**

Salvador – Bahia  
2015

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.**

R696 Rodrigues, Gabriele Costa

Avaliação da resposta imune em ovinos co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* / Gabriele Costa Rodrigues Diz. – Salvador, 2015.

151 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer do Nascimento

Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2015.

1. Linfadenite Caseosa. 2. *Haemonchus Contortus*. 3. Infecção. 4. Antígenos Secretados. 5. Imunomodulação I. Rodrigues, Gabriele Costa. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.428-002



## Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Universidade Federal da Bahia - UFBA  
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
 Av. Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela  
 40100-000, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: [renorbioba@hotmail.com](mailto:renorbioba@hotmail.com)

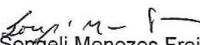
### ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da **Gabriele Costa Rodrigues Diz**. Aos vinte e seis de dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quinze, às nove horas no Auditório Ophélia Gaudenzi terceiro andar no Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA) se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora de Defesa de Tese composta pelos Professores e Doutores: **Roberto José Meyer Nascimento** orientador, **Songeli Menezes Freire**, **Ricardo Wagner Dias Portela** **Vera Lucia Costa Vale**, **Lília Ferreira de Moura Costa** e **Soraya Castro Trindade** perante o qual a Doutoranda **Gabriele Costa Rodrigues Diz**, aluno regularmente matriculado no Curso de Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Bahia, defendeu, para preenchimento do requisito de Doutor, sua tese intitulada **Avaliação da resposta imune em ovinos co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus***. A defesa da referida tese ocorreu, das quatorze horas às 17:00, tendo a Doutoranda **Gabriele Costa Rodrigues Diz** sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da Banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a Doutoranda APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito SATISFATORIO.

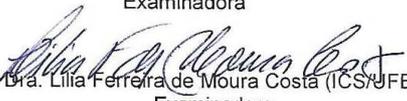
Eu, Roberto José Meyer Nascimento, que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Salvador, vinte e seis de fevereiro de 2015.

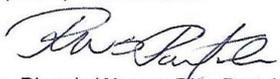
  
 Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento – UFBA  
 Orientador

  
 Profa. Dra. Vera Lucia Costa Vale (UNEB)  
 Examinadora

  
 Profa. Dra. Songeli Menezes Freire (ICS/UFBA)  
 Examinadora

  
 Profa. Dra. Soraya Castro Trindade  
 (UEFS) Examinadora

  
 Profa. Dra. Lília Ferreira de Moura Costa (ICS/UFBA)  
 Examinadora

  
 Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela (ICS/UFBA)  
 Examinador

*Aos meus pais,  
Wilson Marcelino Rodrigues  
e Zélia Costa Rodrigues,  
que foram meus pilares na  
conciliação do doutorado  
com o meu bem maior  
(Yasmim Rodrigues Diz).*

## AGRADECIMENTOS

- ✓ A Rede Nordeste de Biotecnologia pela oportunidade de conhecer novas áreas do conhecimento, integrando diversas especialidades e pesquisas.
  
- ✓ Ao meu orientador Roberto Meyer pelo acolhimento e ensinamentos cedidos ao longo desses anos.
  
- ✓ A família LABIMUNO pela parceria e amizade, que tornaram a produção científica mais leve e bem-sucedida.
  
- ✓ A meus pais pelo incentivo, confiança e principalmente pelo tempo e apoio doados para suprir minhas necessidades pessoais enquanto eu dediquei meus esforços ao doutorado.
  
- ✓ A minha vida que veio a este mundo para me ensinar o significado de superação, amor incondicional e força para não desistir mesmo quando tudo parece desfavorável.
  
- ✓ A Deus e a espiritualidade que me amparam sempre.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. A LINFADENITE CASEOSA.....	17
2.2. O AGENTE ETIOLÓGICO.....	18
2.3. 1. Aspectos Taxonômicos.....	18
2.3.2. Características morfológicas, tintoriais e bioquímicas de crescimento.....	19
2.3. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	20
2.3. 1. Lipídios de parede.....	21
2.3. 2. Exotoxina.....	21
2.3. 3. Proteínas ligadas ao metabolismo do ferro.....	22
2.3. 4. Ácidos Corinomicólicos.....	23
2.3.5. Cp40.....	23
2.3.6. Outros possíveis fatores de virulência.....	25
2.4. ANTÍGENOS DE <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	25
2.5. TRANSMISSÃO E SINAIS CLÍNICOS.....	29
2.6. PREVALÊNCIA DA LINFADENITE CASEOSA.....	32
2.7. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	34
2.8. IMUNIDADE.....	35
2.8.1. Imunidade Humoral.....	36
2.8.2. Imunidade Celular.....	38
2.9. <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .....	43
3. JUSTIFICATIVA.....	46
4. OBJETIVOS.....	48
4. 1. OBJETIVO GERAL.....	48
4. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
5. 1. ANIMAIS.....	49

<b>5. 2. COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>49</b>
<b>5.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>49</b>
5.3.1. Experimento I.....	50
5.3.1.1. Acompanhamento da Resposta Imune.....	50
5.3.2. Experimento II.....	51
5.3.2.1. Acompanhamento da Resposta Imune.....	51
<b>5.4. LINHAGEM BACTERIANA.....</b>	<b>52</b>
<b>5.5. ANTÍGENOS DE <i>C. pseudotuberculosis</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>5.6. ELISA Indireto para <i>C. pseudotuberculosis</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>5.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....</b>	<b>55</b>
<b>5.8. WESTERN BLOTTING.....</b>	<b>55</b>
<b>5.9. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INTERFERON-GAMA.....</b>	<b>57</b>
<b>5.10. EXAMES PARASITOLÓGICOS.....</b>	<b>57</b>
<b>5.11. DOSAGEM DE PROTEINAS.....</b>	<b>58</b>
<b>5.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>58</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
<b>6.1. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DA FRAÇÃO Q5 EM SDS-PAGE.....</b>	<b>59</b>
<b>6.2. PRODUÇÃO IN VITRO DE IFN- <math>\gamma</math> EM CULTURA DE SANGUE TOTAL FRENTE AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO Q5, AO LONGO DA INFECÇÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6.3. PRODUÇÃO DE IGG TOTAL PELOS OVINOS AO LONGO DA INFECÇÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>6.4. ACOMPANHAMENTO DA INFECÇÃO PELO <i>H. contortus</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>6.5. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DO ANTÍGENO TPP EM SDS-PAGE.....</b>	<b>65</b>
<b>6.6. PRODUÇÃO IN VITRO DE IFN- <math>\gamma</math> EM CULTURA DE SANGUE TOTAL FRENTE AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO TPP, AO LONGO DA INFECÇÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6.7. PRODUÇÃO DE IGG TOTAL PELOS OVINOS AO LONGO DA INFECÇÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6.8. ACOMPANHAMENTO DA INFECÇÃO PELO <i>H. contortus</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>6.9. WESTERN BLOTTING.....</b>	<b>70</b>

<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	72
7.1. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO.....	72
7.2. A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS AO LONGO DA IMUNIZAÇÃO.....	78
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	81
<b>9. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS</b> .....	83
<b>10. REFERÊNCIAS</b> .....	84
<b>11. APÊNDICE</b> .....	110
ARTIGO 1.....	111
ARTIGO 2.....	135

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletroforese da fração Q5 em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%, corado com Nitrato de Prata.....	59
Figura 2. Produção <i>in vitro</i> de Interferon-gama por células do sangue periférico após estímulo com 20ug de da fração Q5 em ovinos infectados com a linhagem virulenta, ao longo de 90 dias de acompanhamento.....	60
Figura 3. Cinética da produção de IgG total específica anti- <i>C. pseudotuberculosis</i> em ovinos ao longo de 90 dias de observação.....	62
Figura 4. Medianas dos valores de OPG nos animais dos grupos Ct e CpxHc, ao longo de 90 dias de infecção.....	64
Figura 5. Eletroforese do antígeno TPP em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%, corado com Nitrato de Prata.....	65
Figura 6. Produção <i>in vitro</i> de Interferon-gama por células do sangue periférico após estímulo com 40ug do antígeno TPP em ovinos infectados com a linhagem virulenta, ao longo de 240 dias de acompanhamento.....	66
Figura 7. Cinética da produção de IgG total específica anti- <i>C. pseudotuberculosis</i> em ovinos ao longo de 240 dias de observação.....	69
Figura 8. <i>Western Blotting</i> das amostras de soro dos animais infectados com <i>C. pseudotuberculosis</i> ( $4,4 \times 10^7$ CFU) e co-infectados (Cp $4,4 \times 10^7$ CFU/Hc 12 mil L3, dos tempos 0, 30, 90, 180 de infecção, realizado com antígeno TPP de uma linhagem virulenta.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$  – alfa

$\beta$  - beta

BHI – meio de infusão de cérebro e coração

*C. pseudotuberculosis* – *Corynebacterium pseudotuberculosis*

CFU – unidade formadora de colônias

°C – graus célsius

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

h - hora

Hz – hertz

ICS – Instituto de Ciências da Saúde

IgM – Imunoglobulina M

KDa - kilodaltons

LC – linfadenite caseosa

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{m}$  - micrômetro

$\mu\text{l}$  – microlitros

*M. tuberculosis* – *Mycobacterium pseudotuberculosis*

PBS – salina tamponada com fosfato

PBS-T – salina tamponada com fosfato e com adição de Tween

PCR – reação em cadeia da polimerase

PLD – fosfolipase D

PWM – pokeweed

SDS-page – eletroforese em gel com dodecil-sulfato de sódio

TPP – partição por três fases

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

Vol. – volume

$\gamma$  - gama

## RESUMO

### **Avaliação da resposta imune em ovinos co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus***

Linfadenite caseosa é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente caprinos e ovinos, e é caracterizada pela formação de lesões caseosas nos linfonodos externos e internos, assim como em alguns órgãos. Visando esclarecer a influência do *Haemonchus contortus*, na modulação imune da Linfadenite Caseosa, esse trabalho consistiu em dois modelos experimentais de co-infecção (I e II) nos quais ovinos infectados com a linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* foram comparados ao grupo de animais co-infectados. A resposta imune celular foi avaliada pela expressão de IFN- $\gamma$  e a imunidade humoral pela produção de IgG-anti-*C. pseudotuberculosis*, durante 90 (I) e 240 dias (II). As metodologias diferiram quanto a dose de bactéria inoculada ( $10^7$ CFU-I,  $4,4 \times 10^7$ CFU-II), administração da larva L3 do helminto (naturalmente infectados (I), 12 mil L3/animal via oral (II) e antígenos secretados para estimular a cultura de sangue periférico (Fração Q5(I) e Antígeno total TPP (II)). Os antígenos utilizados foram obtidos de cultivo de *C. pseudotuberculosis* seguida pela técnica de separação e purificação em três fases e cromatografia de troca iônica. Os resultados encontrados com a citocina mostrou produção significativa desta em ambos os experimentos, especialmente sob o estímulo de TPP e que a expressão decresceu em diferentes proporções no grupo dos co-infectados em todos os tempos analisados, denotando provável modulação negativa da resposta clássica Th1, em ovinos com LC. A resposta imune humoral foi intensa para os grupos infectados com *C. pseudotuberculosis* (Cp e CpxHc), sem diferenças na produção de IgG no experimento (II), enquanto no experimento (I) a cinética de IgG no grupo CpxHc foi mais elevada quando comparado ao grupo Cp.

As Palavras-Chaves: Linfadenite Caseosa, *Haemonchus contortus*, co-infecção, antígenos secretados, imunomodulação.

## ABSTRACT

### **Evaluation of immune response in co-infected sheep with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Haemonchus contortus***

Caseous Lymphadenitis is a chronic infectious disease that mainly affects sheep and goats, and is characterized by the formation of caseous lesions on the external and internal lymph nodes, as well as in some organs. In order to clarify the influence of *Haemonchus contortus*, in immune modulation of caseous lymphadenitis, this work consisted of two experimental models coinfection (I and II) in which sheep infected with *C. pseudotuberculosis* virulent strain were compared to group of animals infected with both infections. The cellular immune response was measured by IFN- $\gamma$  expression and the humoral immunity by the production of IgG anti-*C. pseudotuberculosis*, for 90 (I) and 240 days (II). The methods differed the dose of inoculated bacteria (107CFU-I, 4,4x107CFU-II), L3 larvae administration of helminth (naturally infected (I) 12 000 L3 / animal infected orally (II) and secreted antigens to stimulate the peripheral blood culture (Q5 fraction (I) and full antigen TPP (II). The antigens used were obtained from cultivation *C. pseudotuberculosis* followed by separation and purification technique of three-phase and ion exchange chromatography. The results with the cytokine showed significant production of this in both experiments, especially under the stimulus of TPP and the expression decreased in different proportions in the group with both infections in all analyzed times, denoting likely negative modulation of Th1 classic answer, in sheep with LC. The humoral immune response was intense for the groups infected with *C. pseudotuberculosis* (Cp and CpxHc), no differences in IgG production in the experiment (II) as in experiment (I) the IgG kinetic CpxHc in group was higher compared the Cp group.

The key words: Caseous Lymphadenitis, *Haemonchus contortus*, co-infection, secreted antigens, immunomodulation.

## 1. INTRODUÇÃO

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

A transmissão da doença ocorre principalmente através da pele ferida, mas também pelo aleitamento por fêmeas contaminadas e por aerossóis (BATEY, 1996b). A bactéria, ao penetrar no organismo do hospedeiro é carregada 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 enfermidade resulta na diminuição da produção de carne, leite, desvalorização da pele e aumento do custo de mão-de-obra destinado ao tratamento das lesões superficiais (ALVES E OLANDER, 1999).

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

As proteínas secretadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* parecem ter um papel fundamental na indução de uma resposta celular protetora (BURRELLS *et*

*al.*, 1995). Segundo Andersen e colaboradores (1991), o crescimento de *M. tuberculosis* resulta na liberação de proteínas excretadas no meio, ativamente liberadas, nos primeiros dias da cultura. Em seguida são liberadas proteínas secretadas que atravessam a membrana citoplasmática e se localizam externamente à parede celular, sendo liberadas gradualmente durante o crescimento bacteriano. Kaufmann e Hess (1999) sugeriram que antígenos secretados de *M. tuberculosis*, seriam mais eficazes que os antígenos somáticos para compor uma vacina e para utilização em testes diagnósticos para bactérias intracelulares.

Dentre os parasitos de maior impacto negativo na ovinocultura destaca-se o *Haemonchus contortus*, que corresponde de 75% a 100% dos resultados encontrados em exames de contagem de ovos por grama de fezes. (MORTENSEN *et al.*, 2003). As Infecções por *H. contortus* podem apresentar diferentes cursos clínicos, que vão desde casos crônicos em animais velhos com baixa carga parasitária a surtos agudos e frequentemente fatais nos animais jovens ou aqueles animais que não foram expostos previamente ao parasito. O principal mecanismo patogênico esta relacionado à alimentação hematófaga dos estágios pré-adulto e adulto na mucosa do abomaso, o que leva à anemia, palidez na mucosa, edema submandibular (devido à hipoproteinemia), perda de apetite, da motilidade intestinal, diarreia, fraqueza, inapetência, emagrecimento e morte de animais altamente infectados (ROWE *et al.*, 1988; RAHMAN e COLLINS, 1990).

Animais geneticamente resistentes à infecção pelo *H. contortus*, apresentam uma forte resposta imune do tipo Th2, sugerindo que os linfócitos TCD4+ com este perfil são decisivos na resistência natural à infecção pelo parasito (GILL *et al.*, 2000;

PENÃ et al., 2006). O papel dos eosinófilos tem sido frequentemente associado também à resistência ao *H. contortus* (MILLER, 1996; MUÑOZ-GUZMÁN et al., 2006). Juntamente com a imunidade humoral, caracterizada pela formação de anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE, sendo essa última a mais importante, observa-se também a imunidade celular (WATSON, 1986; MILLER, 1996).

Assim, a significativa patogenicidade destas duas enfermidades, ambas de expressivas prevalências nos rebanhos pequenos ruminantes do Nordeste brasileiro, reflete o prejuízo gerado ao bom desempenho geral do rebanho.

Levando-se em conta que um desvio de resposta imune para o perfil Th2 provocado pela infecção com este helminto pode se tornar num fator de progressão da linfadenite caseosa, neste trabalho avaliou-se aspectos da resposta imune gerada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos co-infectados com o mencionado *Haemonchus contortus*, buscando-se esclarecer possíveis mecanismos de interferência do helminto na ação patogênica desta bactéria e na consequente evolução da doença nestes animais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A LINFADENITE CASEOSA

Doença de pequenos ruminantes trata-se, como inicialmente comentado, de uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, tendo a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* como seu agente etiológico. A infecção por este microrganismo afeta também outros animais, como equinos e bovinos, nestes casos não como uma linfadenite. Como doença ocupacional pode atingir seres humanos (BENHAM *et al.*, 1962; CAMERON E MINNAR, 1969; LOPEZ *et al.*, 1966; BATTEY E TONGE, 1968; BATEY, 1986a; PEEL *et al.*, 1997). No Nordeste brasileiro ocorre com alta prevalência nos rebanhos caprinos e ovinos, resultando em graves prejuízos econômicos para esta região, especialmente para as populações rurais que dependem destes animais como cultura de subsistência (MOURA COSTA *et al.*, 1973; COSTA FILHO, 1974; UNANIAN *et al.*, 1985; BROWN *et al.*, 1987; RIBEIRO *et al.*, 1988; MEYER, 2003).

A doença caracteriza-se por um quadro de granulomas nos linfonodos, com material necrótico de cor esbranquiçada (AYERS, 1977), que não leva à morte, mas compromete o seu desempenho, uma vez que resulta em redução do peso e da produção do leite, causa danos à pele, dificulta a comercialização da carcaça, podendo comprometer exportação e importação de animais (UNANIAN *et al.*, 1985; RIBEIRO *et al.*, 1988; ALVES e OLANDER, 1999). O tratamento com antibióticos é

dificultado pelo fato de drogas não penetrarem nos granulomas, não atingindo níveis bactericidas. A drenagem dos granulomas superficiais leva a contaminação da pele e do ambiente, facilitando a disseminação (NAIRN e ROBERTSON, 1974). Os granulomas internos são de difícil diagnóstico podendo constituir focos de disseminação da doença (ELLIS *et al.*, 1987).

## **2.2. O AGENTE ETIOLÓGICO**

### **2.2.1. Aspectos taxonômicos**

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

O gênero *Corynebacterium* pertence à família *Actinomycetae*, assim como os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Os resultados de hibridização

DNA-DNA, assim como o estudo da sequência do RNA ribossômico, mostram que *Corynebacterium pseudotuberculosis* pertence ao mesmo grupo de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (TAKAHASHI *et al.*, 1997).

### **2.2.2. Características morfológicas, tintórias, bioquímicas e de crescimento**

Morfologicamente esta bactéria apresenta pleiomorfismo, entre elas as cocoides, bacilares ou de bastonetes, podendo ainda se agrupar formando uma estrutura conhecida como paliçada ou letra chinesa. Quanto ao tamanho, mede entre 1-3  $\mu\text{m}$  de comprimento por 0,5-0,6  $\mu\text{m}$  de largura. É uma bactéria séssil, desprovida de flagelos, pêlos, esporos e cápsulas, embora apresente fímbrias (BAIRD & FONTAINE, 2007; BASTOS *et al.*, 2012).

Quando submetida à coloração de Gram, apresenta-se positiva, embora algumas vezes com padrão irregular. Quanto às reações bioquímicas, *C. pseudotuberculosis* apresenta uma ampla capacidade fermentativa (glicose, frutose, manose, maltose e sacarose), produzindo ácido, mas não gases. Apresenta atividade enzimática positiva para catalase, urease e fosfolipase D, sendo esta última um dos seus principais fatores de virulência. Contudo, é negativa para oxidase, esculina, hidrólise de gelatina, digestão da caseína e fermentação da lactose (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA *et al.*, 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007). Pode apresentar variabilidade quanto a algumas características bioquímicas, fato que de acordo com Songer e colaboradores (1988), pode ser atribuído à existência de

biovars e ao uso de diferentes métodos por diferentes pesquisadores. Assim, quanto à redução de nitrato, existem cepas que apresentam esta capacidade (biovar *equi*) e outras não (biovar *ovis*), sendo estas últimas comumente isoladas de caprinos e ovinos (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA *et al.*, 2006a; RUIZ *et al.*, 2011). *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria mesofílica, cuja temperatura ideal de crescimento é 37°C e o pH ideal está entre 7,0 e 7,2 (MERCHANT & PACKER, 1975).

Este microrganismo é exigente do ponto de vista nutricional, crescendo bem em meios enriquecidos como ágar sangue, ágar BHI ou caldo BHI ou meios enriquecidos com soro animal. O crescimento bacteriano em meio líquido ocorre como uma película na superfície, sem turvação do meio, que pode ser desfeita pela agitação formando-se flocos que precipitam (MERCHANT & PACKER, 1975; MUCLKE & GYLES, 1982). A película é atribuída aos lipídeos de superfície e a formação de uma película mais densa foi atribuída a uma maior virulência (JOLLY, 1966).

### **2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA**

Apesar do processo patogênico provocado por *C. pseudotuberculosis* não estar completamente definido, alguns fatores de virulência foram identificados, a exotoxina fosfolipase D, lipídeos de parede (WALKER *et al.*, 1994; PEPIN *et al.*, 1999), as proteínas ligadas ao metabolismo do ferro (BILLINGTON *et al.*, 2002), os ácidos corinomicólicos (WILLIAMSON, 2001; BILLINGTON *et al.*, 2002; DORELLA *et*

*al.*, 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007; TROST *et al.*, 2010; AQUINO DE SÁ *et al.*, 2013) e Cp40 (WALKER *et al.*, 1994).

### **2.3.1. Lipídeos de Parede**

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

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

### **2.3.2. Exotoxina**

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

favorecendo a disseminação do microrganismo a partir do local inicial da infecção (CARNE e ONON, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983).

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

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

### **2.3.3. Proteínas ligadas ao metabolismo do ferro**

O papel de genes *Fag A, B, C e D* de *C. pseudotuberculosis*, tem sido objeto de estudo (BILLINGTON *et al.*, 2002). Dentre estes genes, foram registrados quatro que compõe o operon fag ABC, o qual é responsável pela expressão de proteínas envolvidas na captação de ferro (transportador ABC) que contribuem para a

persistência bacteriana em modelo de infecção caprina. Estes genes são regulados pela disponibilidade de ferro do ambiente, sendo mais bem expressos em condições de restrição de elemento químico. Este sofisticado mecanismo foi amplamente descrito em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo possível encontrar diversos trabalhos publicados sobre as bases moleculares da captação de ferro, e as moléculas envolvidas são comumente denominadas de sideróforos (HEINRICHS *et al.*, 1999). Observou-se que particularmente o gene mutante do *Fag B* diminuía a virulência dessa bactéria em caprinos (GRIFFITHS, 1990).

#### **2.3.4. Ácidos Corinomicólicos**

Formam uma camada cerosa protetora, revestindo a parede celular da bactéria, protegendo-a contra a digestão enzimática intracelular, capacitando sua sobrevivência e proliferação no interior dos macrófagos. Estes ácidos teriam ainda um papel citotóxico reconhecido pela indução de necrose hemorrágica em cobaias, morte de macrófagos em camundongos e a caseificação do tecido infectado (WILLIAMSON, 2001; BILLINGTON *et al.*, 2002; DORELLA *et al.*, 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007; TROST *et al.*, 2010; AQUINO DE SÁ *et al.*, 2013).

#### **2.3.5. CP 40**

Em 1994, Walker e colaboradores identificaram uma proteína de 40 kDa que apresentou poder protetor importante em ovelhas inoculadas com duas doses de 100 µg da mesma, adsorvida em hidróxido de alumínio. A análise dos resultados de *western blotting* mostrou que o soro dos animais vacinados continha anticorpos que

reconheceram apenas o antígeno de 40 kDa. Em 1995, Wilson, Brandon e Walker clonaram e sequenciaram o gene da referida proteína, caracterizando um produto de 379 aminoácidos que apresentou atividade proteolítica e inativação por inibidores específicos de serina proteases. Os pesquisadores propuseram o nome CP40 para designar esta proteína de *C. pseudotuberculosis*. A molécula CP40 é naturalmente secretada em culturas líquidas (WALKER et al., 1994; WILSON et al., 1995).

Droppa (2013) também observou a expressão desta molécula e, testando o seu poder imunogênico em camundongos Balb/c e C57BL/6, relatou uma significativa capacidade de induzir a produção de anticorpos dependentes tanto de um estímulo Th1 como de Th2.

No primeiro sequenciamento do genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Trost e colaboradores (2010) designaram o gene codificador da CP40 com a sigla *cpp* e mencionaram que esta enzima de *Corynebacterium pseudotuberculosis* poderia eventualmente contribuir para a virulência do microrganismo por causa de sua ação proteolítica, mas a atividade enzimática da CP40 não foi detectada em sobrenadantes de culturas e sua função *in vivo* não é conhecida (WILSON, BRANDON & WALKER, 1995).

Embora a proteína CP40 tenha sido inicialmente descrita como uma serina-protease, a ausência de atividade proteolítica em sobrenadantes de culturas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a falta de semelhança da molécula com outras serina-proteases (WILSON, BRANDON & WALKER, 1995), o estudo *in silico* da organização dos domínios da proteína e dados filogenéticos prévios acerca das glicosil-hidrolases, sugerem fortemente que a CP40 é uma endoglicosidase

semelhante ao domínio alfa da enzima EndoE de *Enterococcus faecalis* (COLLIN & FISCHETTI, 2004). Este domínio hidrolisa glicanos presentes na RNase B e IgG, o que poderia ser importante na patogênese e persistência de *E. faecalis* em infecções humanas (COLLIN & FISCHETTI, 2004).

Por estas razões, Trost e colaboradores (2011) propuseram que o gene *cpp* seja renomeado como *ndoE*.

### **2.3.6. Outros possíveis fatores de virulência**

A partir de trabalhos recentes que identificaram cerca de 49 moléculas com prováveis papéis na patogenicidade deste microrganismo (SOARES *et al.*, 2012; CORRÊA, 2014), foi possível destacar fatores de virulência em diversas categorias funcionais da ortologia gênica. Nesse sentido relaciona-se o conjunto composto pelos produtos dos genes *spaC* (pilina para adesão), *nanH* (sialidade para invasão celular), *sodC* (resposta ao estresse oxidativo) e *pknG* (autofosforilação, sinalização). Contudo, faz-se necessária a validação dos resultados obtidos *in silico* em testes *in vitro* e *in vivo*.

## **2.4 ANTÍGENOS DE *C. pseudotuberculosis***

Ellis e colaboradores (1991a) ao estudarem os antígenos ligados à bactéria, através da mesma técnica, avaliaram soros de ovinos naturalmente infectados utilizando como antígeno as proteínas extraídas do sonicado da cultura, encontrando

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

Walker e colaboradores (1994) pesquisaram novos antígenos capazes de conferir proteção contra a linfadenite caseosa pela utilização de sondas de células secretoras de anticorpos. Seus resultados sugerem que os antígenos secretados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* podem ser os responsáveis pela indução de uma resposta celular protetora. Além da fosfolipase D, outros antígenos secretados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* foram identificados por estes pesquisadores, dentre eles o já mencionado CP 40. Este antígeno ao ser utilizado como vacina em ovelhas conferiu uma redução de 82% na proporção de ovelhas infectadas. Este nível de proteção é bastante favorável quando comparado com o obtido com as vacinas comerciais.

Alguns estudos têm demonstrado que as proteínas secretadas são as candidatas mais promissoras para o desenvolvimento de vacinas (HORWITZ, 2000).

Os antígenos utilizados nas pesquisas até hoje são geralmente obtidos da lise bacteriana, inativação da célula inteira, tratamento com solventes ou detergentes ou utilização direta do sobrenadante de cultura. A identificação de moléculas antigênicas reconhecidas por anticorpos em estudos sorológicos, principalmente pelo ELISA e “western blotting”, tem demonstrado aspectos importantes da cinética da infecção ou para o diagnóstico desta enfermidade (VALE, 2001; MOURA COSTA, 2002).

Usando o concentrado do sobrenadante da cultura, Moura Costa (2002) observou antígenos com pesos moleculares da ordem de 20 KDa, 25,1 KDa, 31,6 KDa, 39,8 KDa e 63,1 KDa. A mesma autora analisando as frações antigênicas

contidas nos sobrenadantes de culturas de *C. pseudotuberculosis* em Meio Quimicamente Definido (MQD), através de “western blotting”, reconhecidas pelos soros dos animais infectados e normais, evidenciou os pesos moleculares e frequências de reconhecimentos que se segue: 125kDa (100%), 112kDa (91,6%), 108kDa (95,8%), 85kDa (91,6%), 78kDa (95,8%), 73kDa (95,8%), 67kDa (95,8%), 62kDa (87,5%), 43kDa (75%) 39kDa (95,8%), 31kDa (87,5%) e 15kDa (45,8%). Entre 8 a 11 antígenos com pesos variando entre 16 e 125 kDa (16, 20, 27, 30, 36, 40, 43, 58, 64, 68 e 125 KDa) foram reconhecidos por animais infectados usando-se como antígeno o sobrenadante da cultura obtida pela combinação de três processos de extração e de purificação de macromoléculas, técnica de TPP (PAULE *et al.*, 2004b). Dentre tais frações, destacaram-se aquela designada por Q5, com banda imunodominante com cerca de 21 KDa de peso molecular reconhecida através do *western blotting*. O estudo destas frações tem sido dificultado pela pequena proporção representada pelas mesmas em relação ao conteúdo total excretado/secretado por *C. pseudotuberculosis*.

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

Vale (2005) produziu anticorpos monoclonais contra frações do antígeno secretado por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Testando o reconhecimento antigênico destes anticorpos por “western blotting” frente ao antígeno somático e secretado deste microrganismo, esta pesquisadora evidenciou a especificidade destes anticorpos para uma fração protéica de 75 kDa. Esta molécula, por ser reconhecida tanto na fração somática quanto na secretada, supõe-se que esteja inicialmente ancorada à membrana e que depois seja secretada. Além disso, o tratamento de camundongos com anticorpos monoclonais contra esta referida fração conferiu uma proteção significativa contra um desafio com  $10^4$  UFC de uma linhagem virulenta desta bactéria, demonstrado pelo aumento na sobrevivência dos camundongos tratados em relação aos animais do grupo controle.

Em 2005 Vale conseguiu obter frações cromatográficas utilizando colunas MonoQ, a partir do extrato obtido pela técnica TPP mencionada acima. Testando estas frações, a referida autora demonstrou que uma delas, denominada Q5, apresentava uma maior capacidade de estimular a produção *in vitro* de IFN $\gamma$  a partir de culturas de células esplênicas de camundongos Balb/c. Ainda testando esta fração também como estímulo para a produção de citocinas também a partir de culturas de células esplênicas murinas, Rodrigues (2009) demonstrou que ela induzia uma expressiva produção de TNF- $\alpha$  e IL-4, quando comparada com o antígeno o antígeno secretado bruto, enquanto que a produção de INF- $\gamma$  e IL-10 foi igualmente estimulada por ambos os antígenos.

A busca de novos antígenos de *C. pseudotuberculosis* com potencial para uso em vacinas vem sendo constantemente realizada por diversos grupos de pesquisa

do mundo. No Brasil, através de colaborações entre pesquisadores da Universidade Federal da Bahia e da Universidade Federal de Minas Gerais, proteínas secretadas por diferentes linhagens desta bactéria (obtidas de ovinos, caprinos, equinos, bovinos, bubalinos e camelídeos) foram caracterizadas por espectrometria de massas, sendo estabelecido o exoproteoma do microrganismo (PACHECO *et al.*, 2011). Associado ao estudo proteômico, as análises *in silico* tem acelerado a identificação de potenciais alvos antigênicos para uso em vacinas; desta forma, estabeleceu-se o pan-exoproteoma da espécie (SANTOS *et al.*, 2012), e um trabalho de vacinologia reversa resultou na identificação de 49 alvos antigênicos da bactéria (SOARES *et al.*, 2012), possibilitando se destacar alguns novos fatores de virulência já referidos anteriormente.

## 2.5. TRANSMISSÃO E SINAIS CLÍNICOS

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

no ambiente parece ser o principal fator responsável pela sua transmissão no rebanho.

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

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

O desenvolvimento simultâneo de lesões pulmonares pode ser devido à disseminação da bactéria por via hematogena. A bactéria penetra a partir de lesões

na pele podendo atingir a circulação linfática ou venosa e assim chegar aos pulmões pela artéria pulmonar (NAIRN e ROBERTSON, 1974). No entanto, Ellis e colaboradores (1987) demonstraram que *Corynebacterium pseudotuberculosis* é capaz de penetrar nos pulmões do hospedeiro por inalação, podendo ainda ser inoculado na forma de aerossóis oriundos de animais com infecções pulmonares para a pele lesada de animais recentemente tosados (PATON *et al.*, 1995).

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

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

## 2.6. PREVALÊNCIA DA LINFADENITE CASEOSA

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

A literatura apresenta resultados discrepantes para a prevalência desta enfermidade em rebanhos caprinos e ovinos. Em caprinos do Semiárido nordestino, os trabalhos Costa Filho (1974) e de Unanian e colaboradores (1985) revelaram respectivamente percentuais de 30% de animais clinicamente doentes e de 12% quando a amostragem foi composta de animais de abatedouros (abscessos internos) Ainda de acordo com estes últimos autores, os percentuais cresciam para 42% quando o estudo envolveu animais de criação extensiva (abscessos superficiais). Ainda no Brasil, Brown e colaboradores (1987) observaram uma incidência de 14% em animais de abatedouros. Índices variáveis de prevalência são observados em diferentes Estados da federação. Por exemplo, foram registradas prevalências de 24 a 50% em caprinos no Estado de Pernambuco (RIET-CORRÊA *et al.*, 2007), 15,9% em ovinos abatidos na Paraíba (SOUZA *et al.*, 2011), 12,2% em ovinos assintomáticos e 32,5% em animais com sinais sugestivos de LC no Rio de Janeiro, 8,09% em ovinos na região sul (BELCHIOR *et al.*, 2006), 59,8% em amostras de

ovinos abatidos em São Paulo (DANIEL et al., 2009), 78,9% em caprinos no Estado de Minas Gerais (SEYFFERT et al., 2010), 43,7% em ovinos deste mesmo Estado (GUIMARÃES et al., 2011) e 44% numa criação comercial de ovinos do Distrito Federal (CARMO et al., 2012).

No Estado da Bahia, Meyer (2003), numa ampla investigação sorológica, constatou prevalência variando de 9,2% a 72,2% em 1996 animais de 19 municípios da zona semiárida do Estado da Bahia. Este pesquisador registrou um percentual médio de 46,66%. Dentre as três microrregiões estudadas, Baixo e Médio São Francisco evidenciaram prevalência de 58,01%, Piemonte da Diamantina e a microrregião Nordeste apresentaram prevalências de 37,76% e 31,67%, respectivamente. O autor acredita que as variações percentuais apresentam um comportamento relativamente homogêneo, quando se leva em conta a mesma região, e que provavelmente, estas diferenças nos percentuais estejam relacionadas com o tamanho da população caprina e com as densidades populacionais, que são maiores na região do Baixo e Médio São Francisco. Ainda na Bahia, Bastos e colaboradores (2011) registraram uma soroprevalência de 55,3% em ovinos de uma fazenda comercial com um rebanho de 2500 animais e Nascimento (2012) observou sorologia positiva em 22,1% de reprodutores ovinos em exposições agropecuárias.

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

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

## **2.7. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

A forma visceral (abscessos nos órgãos internos) é a causa da significativa perda econômica na indústria de caprinos e ovinos devido à condenação de carcaças. A forma superficial (abscessos nos linfonodos periféricos) leva à formação de cicatrizes que desvalorizam a pele. Outras causas de perdas econômicas incluem desvalorização do produto devido à redução no ganho de peso e da produção de lã, além da redução na produção de leite e da eficiência reprodutiva (PATON, 1997).

No nordeste brasileiro, região que concentra aproximadamente 90% do rebanho caprino e 40% do rebanho ovino nacional e onde a venda de pele é uma importante fonte de renda para o pequeno produtor local, estimou-se que a presença de defeitos superficiais reduziria o valor mercadológico das peles em até 40% (MOURA COSTA *et al.*, 1974; FIGUEIREDO *et al.*, 1982).

## 2.8. IMUNIDADE

A imunidade estabelecida frente a este microrganismo, bactéria intracelular facultativa, é complexa e envolve tanto mecanismos da resposta imune inata, quanto adaptativa. Na resposta imune inata, os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas no início da infecção 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). Uma vez que, estas células são as responsáveis em realizar a fagocitose e destruição dos microrganismos invasores (NORTH, 1978). Entretanto, bactérias intracelulares patogênicas sendo resistentes à degradação dentro dos fagócitos, principalmente por alterar a produção de óxido nítrico destas células, tendem a causar infecções crônicas, difíceis de serem erradicadas (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983), necessitando então do auxílio de uma resposta imune adaptativa que favoreça a ação da fagocitose para eliminar/conter o microrganismo, no caso *C. pseudotuberculosis*. Desta forma, um envolvimento das células T CD4<sup>+</sup>, subpopulação Th1, torna-se uma importante ferramenta (JOLLY, 1965b; LAN *et al.*, 1998).

A incapacidade do macrófago em eliminar o agente patogênico pode ser atribuída à ausência de produção do óxido nítrico quando submetidos à estimulação com antígenos de *C. pseudotuberculosis*, como sugeriram os estudos de Bogdan e colaboradores (1997), com macrófagos pulmonares ovinos. Considerando a importância do óxido nítrico na eliminação de patógenos intracelulares, a não

produção deste agente em resposta aos componentes bacterianos explicaria o desenvolvimento de infecções exclusivamente crônicas observadas em pequenos ruminantes (GREEN *et al.*, 1991). Estes dados são corroborados com os resultados de Oliveira Neto (2012), trabalhando com camundongos *knockout* da enzima sintetase do óxido nítrico.

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

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

### **2.8.1. Imunidade Humoral**

A resposta imune por anticorpos e a identificação de frações antigênicas responsáveis pela imunidade protetora foram investigadas por diversos autores. A resposta imune para a infecção natural por *C. pseudotuberculosis* tem mostrado incluir um forte componente humoral, com detecção de anticorpos circulantes para

um grande número de antígenos (ELLIS *et al.*, 1991). Os pesos moleculares desses antígenos variam entre 22 e 120 KDa; 5 e 200 kDa e, em menor proporção, 68, 64, 43 e 22 KDa identificadas pela técnica de “western blotting”, utilizando-se antígenos somáticos e secretados (VALE *et al.*, 2003; PAULE *et al.*, 2003 e 2004b). No entanto, esta forte resposta humoral é incapaz de eliminar a infecção (VALE *et al.*, 2003).

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

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

infecção exercem efeito protetor dificultando a disseminação da bactéria para os linfonodos.

A resposta imune humoral é uma resposta intensa e presente em animais imunizados e naturalmente infectados (DORELLA, 2006). Esta resposta por anticorpos é regulada por citocinas produzidas em decorrência da interação do antígeno com as células imunocompetentes (MCINTYRE *et al.*, 1993).

### **2.8.2. Imunidade Celular**

Os primeiros ensaios que destacaram a importância da resposta celular na proteção contra infecções por *C. pseudotuberculosis* mostraram que no modelo murino a resolução da infecção estava associada à presença de macrófagos ativados dentro da lesão (JOLLY, 1965b). Hogdson e colaboradores (1992) registraram alta produção de  $IFN\gamma$  por ovinos desafiados com linhagens virulentas de *C. pseudotuberculosis*. Outros experimentos confirmaram o envolvimento da resposta celular, mais especificamente, da indução de uma resposta Th1, que é comprovadamente importante na resistência contra bactérias intracelulares facultativas (KAUFMANN, 1993).

Estudos têm demonstrado a importância de citocinas no combate a *Corynebacterium pseudotuberculosis* (LAN *et al.*, 1998). A IL-12 é conhecida pela capacidade indutora do perfil Th1, na estimulação de  $TNF\alpha$  e  $INF\gamma$  por células CD4+, CD8+, NK e macrófagos (TRINCHIERI, G. E SCOOT, P., 1995). Em infecções causadas por *C. pseudotuberculosis* foi demonstrado, através da técnica de RT-PCR semiquantitativa, o aumento dos níveis de  $TNF\alpha$  e IL-1, associado a baixas

concentrações de IL-4 em ovinos experimentalmente infectados (PÉPIN *et al.*, 1997). Nestes animais verificou-se alta expressão de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF $\alpha$  no sítio de inoculação, enquanto que a expressão de citocinas associadas às células T, como IL-12 e IL-4, foi mais intensa no linfonodo drenante. Com base nos resultados deste estudo, os autores sugeriram que o desenvolvimento do granuloma poderia ser consequência de células Th1, Th2 e de citocinas como INF- $\gamma$  IL-12, IL-4, TNF $\alpha$  e MCP-1, cujos níveis estavam elevados durante a sua formação.

As células T CD4 e, principalmente os seus clones Th1, são responsáveis pela produção de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , citocinas que aumentam a atividade bactericida dos macrófagos. O papel protetor das células T CD8 está relacionado à sua capacidade de produzir IFN $\gamma$  e lisar células infectadas. Em murinos, a administração de anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 aumentaram a letalidade e levaram à redução de interferon  $\gamma$ , sugerindo que ambas as sub-populações de linfócitos são essenciais no processo de resistência à *C. pseudotuberculosis* (LAN *et al.*, 1999).

O IFN $\gamma$  é uma citocina extremamente pleiotrópica e muito importante na regulação da resposta imune e nos processos inflamatórios. A modulação da resposta imune pelo controle da expressão das moléculas de MHC classes I e II por diversos tipos de células, a ativação e regulação da diferenciação de fagócitos e a habilidade para regular a ativação e a diferenciação das células T CD4+ estabelecem o IFN $\gamma$  como um componente chave na determinação do tipo de função que é desenvolvida durante o curso da resposta imune (ABBAS *et al.*, 2012). A sua expressão *in vitro* em culturas de sangue periférico de caprinos infectados com *C.*

*pseudotuberculosis* foi bem maior quando o estímulo foi feito com antígenos solúveis do que com antígenos secretados por este microrganismo (MEYER *et al.*, 2005).

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

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

A citocina IL-10 inibe nas células fagocíticas e células apresentadoras de antígenos a transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IL-12, a expressão do MHC de classe II, moléculas co-estimulatórias, bem como a

produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (OSWALD *et al.*, 1992; MOORE *et al.*, 2001).

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

A IL-10 e a IL-4 são citocinas do perfil Th2, possuindo um caráter antiinflamatório (ABBAS, LINCHTMAN E PROBER, 2012). No entanto, a IL-10 pode também ser produzida por células Th1 atuando como uma citocina regulatória ao impedir a exacerbação de uma resposta inflamatória danosa ao hospedeiro (TRINCHIERI, 2001). Esta citocina pode bloquear a ação ou produção de IL-12, TNF- $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-4 e GM-CSF e a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e MHC classe II, limitando a magnitude de ativação e efeitos das citocinas liberadas por células T durante a resposta imune específica (PESTAKA *et al.*, 2004). A sua produção *in vitro* em modelo murino de infecção experimental com *C. pseudotuberculosis* tem sido observada quando culturas de células esplênicas destes animais são estimuladas por diferentes frações do antígeno secretado (VALE, 2005, RODRIGUES, 2009).

A citocina IL-12 tem sido descrita como uma citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos e células B em resposta a infecções bacterianas. A IL-12 induz a secreção IFN $\gamma$  pelas células T e células NK. Além disso, esta citocina é capaz de induzir a secreção tanto de IFN $\gamma$  como IL-10 pela mesma célula T, tanto que a

utilização de anticorpos monoclonais contra a IL-12 aboliu a geração desse sub-tipo de células (POHL-KOPPE *et al.*, 1998).

As células aderentes da cavidade peritoneal de camundongos C57black/6, quando estimuladas com antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis* produziram IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10, INF $\gamma$  e TNF $\alpha$  quando infectados com 10<sup>7</sup> da estirpe atenuada e as citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, INF $\gamma$  e GM-CSF, quando infectados com 10<sup>2</sup> da estirpe selvagem. Desta forma, foi possível identificar a produção de citocinas pró-inflamatórias por esta linhagem de camundongo. Ao avaliarmos as citocinas após a infecção com 10<sup>2</sup> da bactéria C57 foi identificado, nos camundongos C57black/6 uma intensificação na produção de IL-13, IL-22 e IL-27. Somando-se a estes resultados a produção de INF- $\gamma$  visto nos animais C57black/6, esta linhagem tem a produção de citocinas voltadas para a um perfil Th1. As duas evidências podem contribuir com o caráter resistente dos animais C57black/6 a infecção de *C. pseudotuberculosis* (FRAGA, 2012).

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

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram que os granulomas são formados internamente de um centro necrótico cercado até a periferia por uma zona de macrófagos e uma zona de linfócitos, limitado externamente por uma cápsula fibrótica. A zona de linfócitos é rica em linfócitos TCD4+ e B, ao lado da cápsula fibrótica (WALKER *et al.*, 1991; PÉPIN *et al.*, 1994).

A organização e composição celular dos granulomas provocados pela infecção por *C. pseudotuberculosis* são similares nas infecções por outras bactérias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (FLYNN *et al.*, 1993) ou *Listeria monocytogenes* (NAKANE *et al.*, 1989). Dentre os pontos em comuns, destacam-se a predominância dos linfócitos T CD8 (MODLIN *et al.*, 1983) que atuam diretamente como células citotóxicas, ou como ativadoras de macrófagos via IFN- $\gamma$  (KAUFMANN, 1988), ou ainda, indiretamente, podendo apresentar um fenótipo supressor (MODLIN *et al.*, 1983).

## **2.9 HAEMONCHUS CONTORTUS**

O nematódeo gastrointestinal *Haemonchus contortus* infecta ruminantes, particularmente caprinos e ovinos, resultando em perdas econômicas evidenciadas através da alta taxa de mortalidade e comprometimento no desempenho produtivo, que são decorrentes do atraso no crescimento, da queda na produção leiteira e da baixa fertilidade (ALLONBY e URQUHART, 1975; CHARLES *et al.*, 1989).

Esse nematódeo pode ser encontrado em todo o mundo, embora as infecções sejam mais frequentes e intensas em áreas com climas quentes e úmidos (RADOSTITS *et al.*, 2000). O parasito nos pequenos ruminantes possui um ciclo evolutivo direto, com um período de desenvolvimento no meio ambiental, denominado de fase de vida livre, que inicia-se com a liberação dos ovos nas pastagens, através das fezes e o desenvolvimento em larvas infectantes (L3), com uma duração de aproximadamente sete dias. E a fase parasitária, que ocorre no

hospedeiro, inicia-se com a ingestão das larvas infectantes junto com a pastagem, evoluindo no tubo digestivo, onde o maior número de parasitos adultos é encontrado na mucosa da região fúndica do abomaso (RAHMAN e COLLINS, 1990).

As infecções por *H. contortus* podem apresentar diferentes cursos clínicos, que vão desde casos crônicos em animais velhos com baixa carga parasitária a surtos agudos e frequentemente fatais nos animais jovens ou aqueles animais que não foram expostos previamente ao parasito. O principal mecanismo patogênico está relacionado à alimentação hematófaga dos estágios pré-adulto e adulto na mucosa do abomaso, o que leva à anemia, palidez na mucosa, edema submandibular (devido à hipoproteinemia), perda de apetite, da motilidade intestinal, diarreia, fraqueza, inapetência, emagrecimento e morte de animais altamente infectados (ROWE et al., 1988; RAHMAN e COLLINS, 1990; HOSTE, 2001).

Como já afirmado anteriormente, animais geneticamente resistentes à infecção pelo *H. contortus*, apresentam uma forte resposta imune do tipo Th2, sugerindo que os linfócitos TCD4+ com este perfil são parte integrante da resistência natural à infecção pelo parasito, podendo atuar sinergicamente com os anticorpos, assim contribuindo para expressão da imunidade adquirida no hospedeiro (GILL et al., 2000; PENÃ et al., 2006). O papel dos eosinófilos tem sido frequentemente associado também à resistência ao *H. contortus* (MILLER, 1996; MUÑOZ-GUZMÁN et al., 2006). Juntamente com a imunidade humoral, caracterizada pela formação de anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE, sendo essa última a mais importante, observa-se também a imunidade celular (WATSON, 1986; MILLER, 1996).

A implantação correta de medidas de manejo podem, em algumas situações, ser mais importante do que o uso de anti-helmínticos, já que o entendimento da dinâmica populacional dos nematódeos nos animais e nas pastagens faz parte da estratégia de controle (FAKAE et al., 1999).

### 3. JUSTIFICATIVA

O Brasil hoje é o 8º maior produtor de caprinos e ovinos no mundo, com rebanho superior a 30 milhões de cabeças. A maioria da população de caprinos e ovinos do Brasil é concentrada nas zonas árida e semi-árida do Nordeste, tornando-se uma importante fonte de renda para pequenos produtores dessa região, que obtêm através da venda da carne, leite e pele a garantia para sua sobrevivência (RIBEIRO et al., 1988). O Estado da Bahia é caracterizado por possuir o maior rebanho caprino nacional, com 4,5 milhões de cabeça predominantemente de corte, caracterizada pelo sistema de produção extensiva e às vezes ultra-extensiva. O rebanho de ovinos no Estado ocupa a segunda posição no *ranking* nacional, com quase 3 milhões de animais (ANCO, 2010).

O Nordeste é a região brasileira onde se observa a maior frequência da Linfadenite Caseosa e de nematódeos gastrintestinais, principalmente *Haemonchus contortus*, devido à grande concentração destes pequenos ruminantes e a falta de orientação adequada aos seus criadores, quanto à sanidade de seus rebanhos. Os prejuízos estão relacionados ao retardo na produção, custos com tratamentos profiláticos e curativos e, em casos extremos, à morte dos animais (MACRAE, 1993).

O aprofundamento do conhecimento dos mecanismos imunológicos, do papel de biomoléculas antigênicas ou não, e de variações de virulência do agente por interferência de outras enfermidades, é muito importante para o avanço de técnicas

para o diagnóstico e para o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de induzir uma imunidade protetora contra a Linfadenite Caseosa.

Desta forma, este estudo procurou avaliar interferência do nematódeo *H. contortus* na possível modulação imune contra *C. pseudotuberculosis* em ovinos, frente aos antígenos secretados por *C. pseudotuberculosis*, na infecção com a linhagem selvagem, que é encontrada naturalmente no ambiente de criação dos animais. Uma vez que a infecção por *C. pseudotuberculosis* desenvolve uma resposta Th1 predominante e que o helminto *H. contortus*, bastante frequente nos pequenos ruminantes na região Nordeste, induz uma expressiva estimulação Th2.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

- Avaliar a indução de resposta imune humoral e celular contra o *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos co-infetados com *Haemonchus contortus*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar, através de dosagem *in vitro* de IFN- $\gamma$ , a partir de culturas de sangue periférico estimuladas com os antígenos TPP e Q5, a resposta celular de ovinos infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus*.
- Avaliar, através da mensuração dos níveis séricos de IgG, a resposta humoral de ovinos infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus*.
- Apresentar o estado da arte sobre a estimulação do perfil Th2 de resposta imune na infecção de pequenos ruminantes com o *Haemonchus contortus*, bem como sobre a regulação negativa exercida por este padrão de resposta sobre o perfil Th1.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 ANIMAIS**

Os ovinos utilizados nos experimentos foram animais sem raça definida (SRD), com idade entre três e seis meses de idade, de ambos os sexos, com sorologia negativa para *C. pseudotuberculosis* e inicialmente livres de *Haemonchus contortus*. Os grupos foram mantidos nas condições de criação intensiva, na unidade experimental do Laboratório de Imunologia, em Salinas da Margarida, BA.

### **5.2. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA**

Este trabalho foi aprovado pelo CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA), sob protocolo nº 071/2014.

### **5.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Para fim de melhor compreensão, os animais submetidos à experimentação foram agrupados em dois distintos delineamentos experimentais, conforme descrição que se segue.

### 5.3.1. Experimento I

Utilizou-se três grupos experimentais, totalizando treze animais:

- **Ct (Grupo Controle):** três animais livres de Hc (*Haemonchus contortus* e de helmintos em geral) e Cp (*Corynebacterium pseudotuberculosis*);
- **CpxHc (Grupo de Co-infecção):** cinco animais co-infectados com Hc e Cp no dia zero;
- **Cp (Grupo infectado com *C. pseudotuberculosis*):** cinco animais infectados com linhagem selvagem Cp no dia zero.

A inoculação do *C. pseudotuberculosis* foi realizada através da via subcutânea, na região pré-escapular direita com  $10^7$  CFU (Unidades Formadoras de Colônias). Os animais do grupo de co-infecção não foram inoculados com *Haemonchus contortus*, pois haviam se infectado naturalmente no ambiente, informação confirmada por OPG e coprocultura.

#### 5.3.1.1. Acompanhamento da resposta imune

O acompanhamento da resposta ocorreu nos dias 0, 15, 30, 60, 90, com coletas de sangue para:

- Cultura de sangue total com estímulo com os antígenos Q5, para a dosagem de IFN-  $\gamma$  ovino.
- Avaliação de anticorpos IgG específicos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* por ELISA indireto.

- Coleta de fezes para OPG e coprocultura.

### 5.3.2. Experimento II

Utilizou-se três grupos experimentais, cada um contendo cinco animais:

- **Hc (Grupo infectado com *H. contortus*):** cinco animais positivos apenas para Hc (*Haemonchus contortus* e de helmintos em geral) e Cp (*Corynebacterium pseudotuberculosis*);
- **CpxHc (Grupo de Co-infecção):** cinco animais co-infectados com Hc e Cp no dia zero;
- **Cp (Grupo infectado com *C. pseudotuberculosis*):** cinco animais infectados com linhagem selvagem Cp no dia zero.

A inoculação do *C. pseudotuberculosis* foi realizada através da via subcutânea, na região pré-escapular direita, numa dose de  $4,4 \times 10^7$  CFU. E a inoculação do *Haemonchus contortus* foi realizada por via oral utilizando as larvas infectantes (L3), totalizando 12 mil L3/12 mL por animal, que foram obtidas a partir de coprocultura de fezes de ovinos infectados com o parasito (MUÑOZ-GUZMÁN *et al.*, 2006).

#### 5.3.2.1. Acompanhamento da resposta imune

O acompanhamento da resposta ocorreu nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 com coletas mensais de sangue para:

- Cultura de sangue total com estímulo com o antígeno TPP, para a dosagem de IFN- $\gamma$  ovino.

- Avaliação de anticorpos IgG específicos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* por ELISA indireto;
- Coleta de fezes para OPG e coprocultura.

#### 5.4. LINHAGENS BACTERIANAS

Em ambos os experimentos utilizou-se uma linhagem virulenta/selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, utilizada para as infecções e para o preparo dos antígenos BHI e TPP e uma linhagem avirulenta/atenuada para o preparo do antígeno Q5. As linhagens são provenientes da Coleção de Microrganismos do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA e foram semeadas em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e a seguir cultivadas a 37°C, por 48 horas.

#### 5.5. ANTÍGENOS DE *C. pseudotuberculosis*

- **Antígeno secretado em meio de Infusão de Cérebro e Coração – BHI da linhagem virulenta**

O cultivo bacteriano foi centrifugado e o sobrenadante aliquoteado e guardado a -20<sup>o</sup> até o momento de ser usado para o acompanhamento sorológico.

- **Obtenção do Antígeno Secretado Total (TPP)**

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

#### ▪ **Cromatografia para obtenção da fração Q5**

A partir da amostra de TPP, proveniente do cultivo da linhagem atenuada, o fracionamento do antígeno secretado de *C. pseudotuberculosis* foi feito por cromatografia de troca iônica de alta performance. Este procedimento foi realizado em coluna de troca aniônica (Mono Q HR 5/5), onde dentre outras frações obteve-se a fração Q5.

O procedimento foi iniciado com a diálise da amostra a ser aplicada na coluna, *overnight* a 5°C em tampão fosfato 50mM, pH 7,4. Após a diálise, a coluna Mono Q HR 5/5 foi eluída com tampão fosfato 50mM, pH 7,4 e uma vez que a coluna estava equilibrada, foi feita a aplicação da amostra, obtendo-se o primeiro pico composto por proteínas que não se ligaram na coluna (Q1). Um gradiente de eluição feito com

injeção de NaCl 1M na proporção de 10% para 90% do tampão fosfato 50mM, com a subsequente obtenção da fração Q2. A proporção da solução com NaCl foi aumentada até 60%, que corresponde ao último pico (fração Q7). A fração Q5 foi obtida com 40% do tampão contendo NaCl 1M; após diálise com PBS 10mM este material foi liofilizado.

### **5.6. ELISA INDIRETO PARA *Corynebacterium pseudotuberculosis***

O protocolo empregado para a realização do ELISA foi descrita por Rebouças *et al.* (2013). As placas foram sensibilizadas com sobrenadante da cultura de 48h de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI, diluído 1:100, em tampão carbonato bicarbonato 0,1KM, pH9,6, sendo incubadas a 4°C por 12-16h. O bloqueio foi realizado com PBS 0,1% Tween-20 (PBS-T) contendo 2% de caseína hidrolisada, durante duas horas a temperatura ambiente. As amostras de soro foram diluídas em PBS-T contendo 1% de caseína hidrolisada na proporção de 1:100 e incubadas por 1 hora. Após lavagens em PBS-T, foram adicionadas imunoglobulinas de asno anti-IgG de ovino conjugada a peroxidase (Bethyl) diluídas em 1:20.000 em PBS-T. Após incubação a 37°C por 45 minutos, foi adicionado o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), sendo a reação interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> após 20 minutos. A leitura foi feita em leitor de microplacas (Microplate Reader BIO-RAD Model 550), utilizando filtro de 450-630 nm de comprimento de luz. O ponto de corte utilizado foi 0,250 de D.O.

## 5.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

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

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

## 5.8. WESTERN BLOTTING

O antígeno utilizado no *western blotting* foi o TPP de uma linhagem virulenta na concentração de 50µg/poço. Este antígeno foi submetido à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. O sistema utilizado foi descontínuo, composto de um gel de empilhamento constituído por 4% de acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 10% SDS, 0,05% de persulfato de amônia, 0,05% de temed e contendo tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. Esse gel foi colocado sobre um gel de corrida constituído por 12% de acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 1,5M tris-HCl pH 8,8, 10%SDS , 0,05% persulfato de amônia, 0,05% de TEMED, contendo ainda tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

A eletroforese foi realizada em tampão de migração contendo tris 0,124 M, glicina 0,96 M, 0,5% de SDS, pH 8,3 durante 2 horas, numa corrente de 30mA. As proteínas separadas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (Millipore), em tampão de transferência contendo tris 0,25 M, glicina 0,193 M e 20% de metanol. Após a transferência, a membrana foi corada com uma solução aquosa de vermelho Ponceau S, descorada em água destilada e cortada em tiras de aproximadamente 3mm. Estas membranas foram bloqueadas com PBS-T (Tampão salina fosfato contendo Tween 20 a 0,05%) em 5% de leite desnatado *overnight* a 4°C. As tiras contidas nos tubos de ensaio foram lavadas com PBS-T, por 5 vezes. Os soros de ovinos imunizados foram diluídos em uma diluição de 1:50 em PBS-T 20 contendo 1 % de leite desnatado e incubados durante 1 hora a 37° C. Passado o período de incubação, as tiras foram lavadas por cinco vezes e em seguida colocou-se em cada tubo 1ml anticorpo de coelho anti-IgG ovino conjugado com peroxidase diluído 1:100 em PBS-T 20. As tiras foram incubadas na posição horizontal por 1h a 37°C e então lavadas por mais cinco vezes com PBS-T, para posterior adição de 3mL de solução reveladora (0,3% de 4 cloro  $\alpha$ -naftol em metanol em uma diluição de 1:5 em PBS, sendo acrescentado 0,33uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para cada mL da solução) em cada tubo por 30 Amin e a reação foi interrompida com a adição de água destilada.

### **5.9. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN $\gamma$**

A dosagem de IFN $\gamma$  foi feita a partir do sobrenadante de cultura de sangue total. As amostras de sangue colhidas (5mL em tubos heparinizados) em cada tempo amostral foram dispostas em placas de 24 poços sendo para cada animal utilizados três poços com 1 mL cada. O primeiro poço sem adição de estímulo correspondeu ao controle negativo, o segundo teve adição do mitógeno pokeweed (PWM), controle positivo e o terceiro teve como estímulo 40 $\mu$ g dos antígenos Q5 ou TPP. O sobrenadante foi coletado após centrifugação das amostras durante 5 minutos a 8000rpm e então submetidos a avaliação da produção de IFN- $\gamma$  através de teste comercial imunoenzimático específico (Kit Ovine IFN-  $\gamma$ , Mabtech, Suécia).

### **5.10. EXAMES PARASITOLÓGICOS**

- **Contagem de ovos por grama de fezes (OPG)**

Os exames coprológicos serão realizados imediatamente após coleta das amostras fecais. Para a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de nematódeos gastrintestinais, será empregada a técnica (GORDON e WHITLOCK, 1939) modificada (WHITLOCK, 1948).

- **Coprocultura**

O cultivo de larvas infectantes de terceiro estágio de *H. contortus* será realizado pelo método de coprocultura descrita por Ueno (1995).

### **5.11. DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

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

### **5.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

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

## 6. RESULTADOS

### ▪ Experimento I

#### 6.1. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DA FRAÇÃO Q5 EM SDS-PAGE

Conforme visualizado na figura 1, Q5 apresenta cinco bandas proteicas que variam de aproximadamente 20 a 75 kDa.

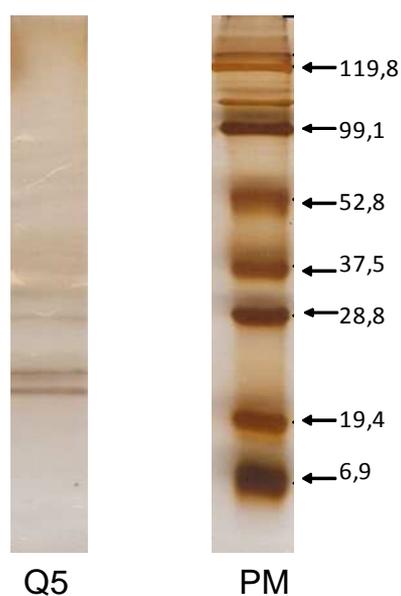


Fig. 1 – Eletroforese da fração Q5 em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%, corado com nitrato de prata. Os números se referem aos pesos moleculares em kDa. PM: Peso Molecular, Q5: Fração Q5

## 6.2. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE IFN- $\gamma$ EM CULTURA DE SANGUE TOTAL FRENTE AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO Q5, AO LONGO DA INFECÇÃO.

Foi dosada a citocina IFN- $\gamma$ , em sobrenadantes de culturas de sangue total de ovelhas, no tempo 0, 15, 30, 60 e 90 dias de infecção com a linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, sob o estímulo da fração Q5.

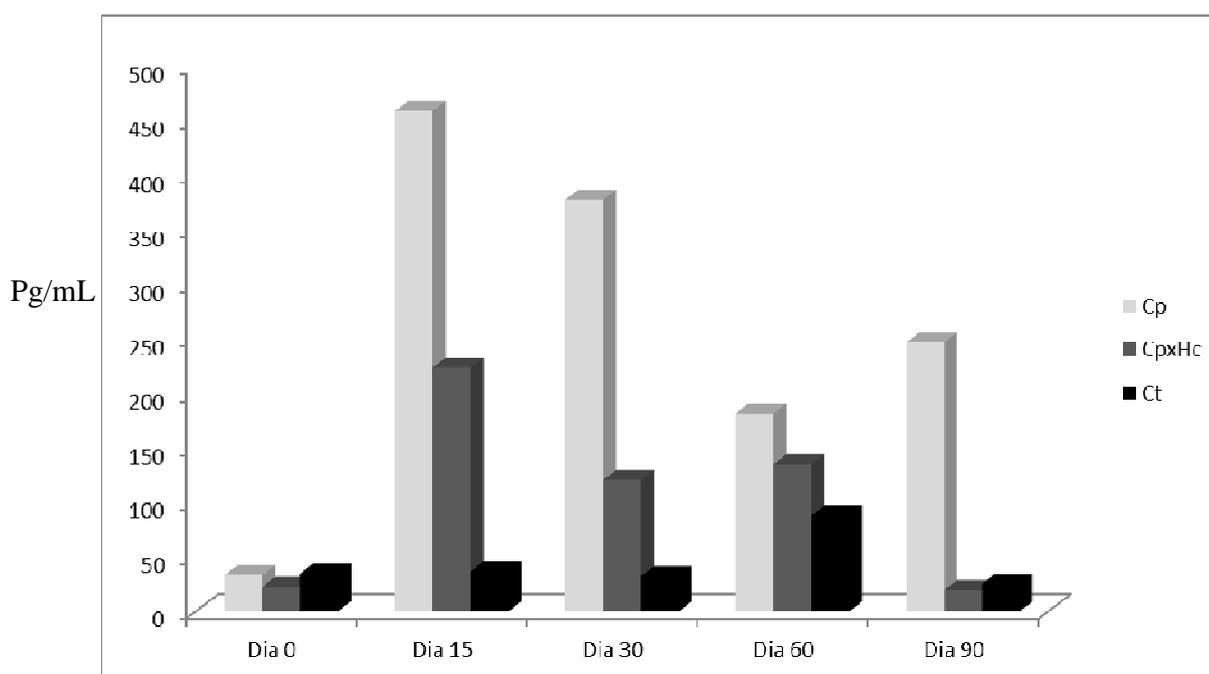


Fig. 2 – Produção *in vitro* de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por células do sangue periférico após estímulo com 40 $\mu$ g de da fração Q5 em ovinos infectados com a linhagem virulenta, ao longo de 90 dias de acompanhamento. Grupo Cp (n=5): Animais infectados com  $10^7$  CFU, Grupo Cp x Hc (n=5): Animais co-infectados com *C. pseudotuberculosis*  $10^7$  CFU e *H. contortus* (naturalmente infectados) e Grupo controle (n=3): Animais inoculados com solução salina 0,9%

Nesta figura observa-se a expressão da citocina IFN- $\gamma$  nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias de infecção, sob o estímulo da fração antigênica Q5, obtida de uma linhagem atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

No tempo zero, a dosagem foi basal para todos os grupos como era esperado. O grupo dos animais infectados com *C. pseudotuberculosis* apresentou uma maior expressão da citocina quando comparado com o grupo de co-infecção em todos os tempos pós-infecção, entretanto sem diferença estatisticamente significativa.

No tempo de 30 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos experimentais, mantendo o padrão de expressão observado a partir dos 15 dias de infecção, com expressão aumentada de IFN-  $\gamma$  no grupo infectado com *C. pseudotuberculosis* ao comparar com o grupo de co-infecção ( $p < 0,05$ ).

Nos tempos de 30 e 60 dias de infecção o grupo de co-infecção apresentou maior expressão desta citocina quando comparada ao tempo zero ( $p < 0,05$ ). O grupo representado pelos animais co-infectados apresentou uma queda estatisticamente significativa aos 90 dias de infecção quando comparados aos 30 dias de infecção ( $p < 0,05$ ). Redução semelhante observou-se no mesmo grupo no tempo 90 dias quando comparada ao tempo de 60 dias de infecção ( $p < 0,05$ ).

Ambos os grupos experimentais apresentaram maior produção da referida citocina em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Os valores referentes aos controles negativos, que não receberam estímulo e aos controles positivos, estimulados com o mitógeno PWM funcionaram a contento, garantindo a qualidade das culturas de sangue periférico. No entanto não foram

incluídos nos gráficos, pois títulos discrepantes comprometeriam a interpretação clara dos dados.

### 6.3. PRODUÇÃO DE IgG TOTAL PELOS OVINOS AO LONGO DA INFECÇÃO.

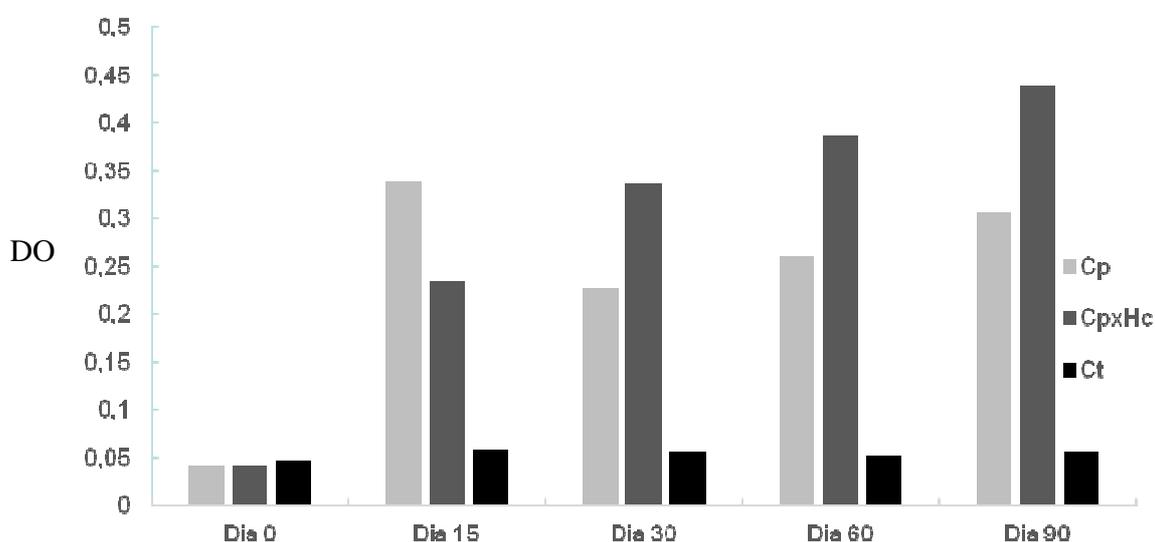


Fig. 3 – Cinética da produção de IgG total específica anti-*C. pseudotuberculosis* em ovinos ao longo de 90 dias de observação. Grupo Cp (n=5): Infectados com a linhagem selvagem  $10^7$  CFU, Grupo Cp x Hc (n=5): Co-infetados com *C. pseudotuberculosis* ( $10^7$  CFU) e *H. contortus* (infecção natural) e Grupo Ct (n=3): Controle inoculado com solução salina 0,9%. ELISA Indireto sensibilizado com antígeno BHI. Ponto de corte utilizado foi 0,250 D.O.

Ao analisar a produção de IgG ao longo do tempo, observou-se que não existe diferença estatisticamente entre os grupos no tempo zero e que o grupo controle apresentou níveis basais durante os 90 dias de infecção.

Os dois grupos de infecção apresentaram produção expressiva de IgG *anti-Corynebacterium*, mas com diferença estatística entre eles somente aos 60 dias após infecção ( $p < 0,01$ ).

Nos dias 30, 60, 90, constataram-se diferenças estatisticamente significantes quando comparados os grupos controle e infectado com *C. pseudotuberculosis* ( $p < 0,01$ ). Ao comparar o grupo de co-infecção com o grupo controle houve diferença aos 60 ( $p < 0,01$ ), 90 dias de infecção.

Foi observado na análise entre os tempos, diferença estatisticamente significativa no grupo Cp, em todos os pontos pós-inoculação em relação ao tempo zero, sendo 15, 30 ( $p < 0,05$ ), 90 dias ( $p < 0,01$ ). No grupo de co-infecção essa diferença só ocorreu entre os dias 0 e 60 ( $p < 0,05$ ).

#### **6.4. ACOMPANHAMENTO DA INFECÇÃO PELO *H. contortus***

A Figura 4 apresenta os resultados da contagem de ovos liberados nas fezes dos animais dos grupos Cp, Co-infecção e Controle. Levando-se em conta o ponto de corte de 700 ovos por grama de fezes, o grupo co-infecção já apresentou valores superiores a este limite no dia 15, enquanto os grupos, infectados com *C.*

*pseudotuberculosis* e controle, se mantiveram abaixo do ponto de corte ao longo do experimento.

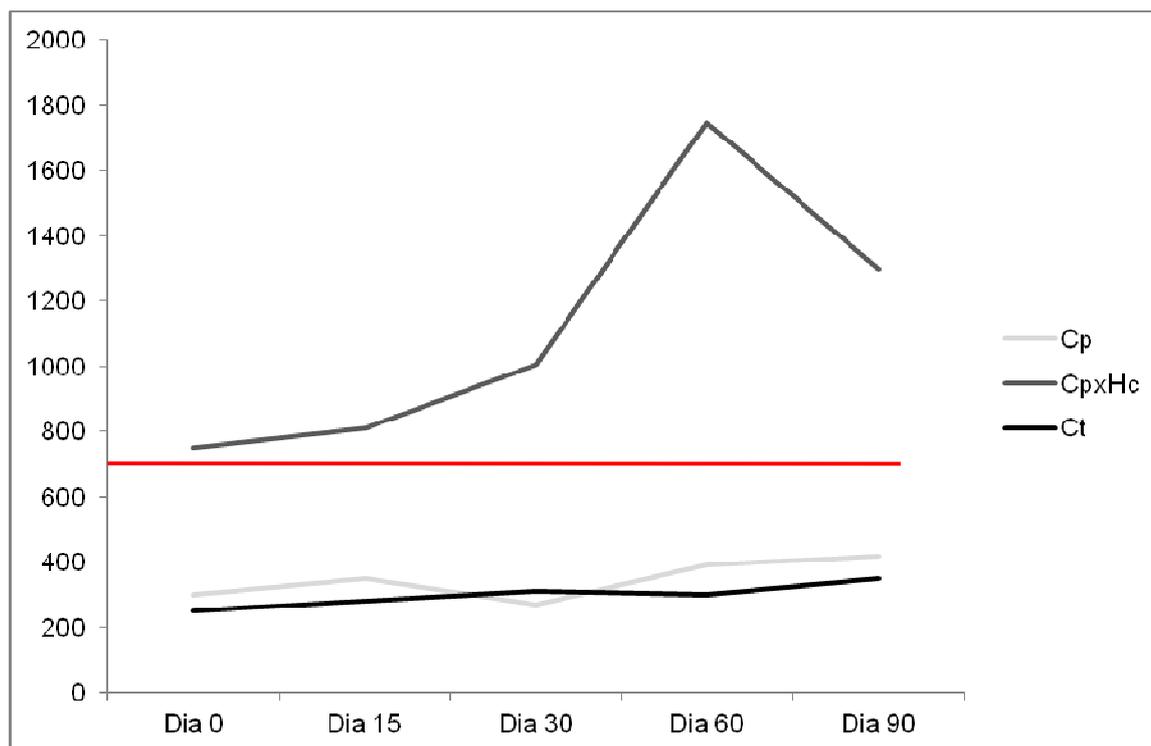


Figura 4 – Medianas dos valores de OPG nos animais dos grupos Cp, CpxHc e Ct, ao longo de 90 dias de infecção (ponto de corte = 700).

- Experimento II

### 6.5. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DA FRAÇÃO TPP EM SDS-PAGE

O antígeno TPP, como pode ser observado na figura 5, apresenta 23 bandas protéicas que variam de aproximadamente 6 até 196 kDa.

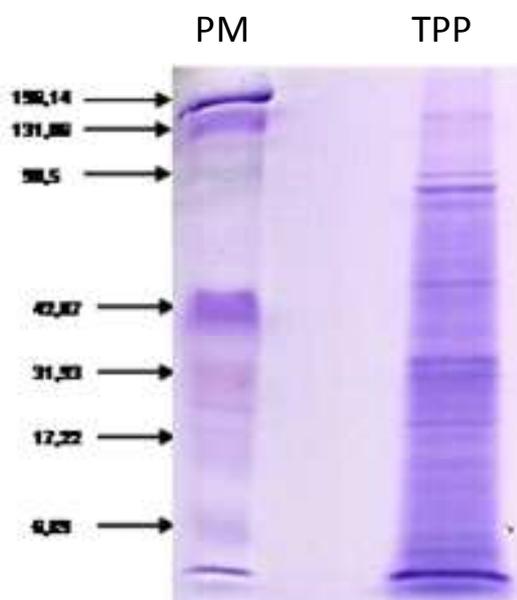


Figura 5 – Eletroforese do antígeno TPP em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%, corado com Azul de Comansie. Os números se referem aos pesos moleculares em kDa. PM: Peso Molecular, TPP: antígeno TPP.

## 6.6. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE IFN- $\gamma$ EM CULTURA DE SANGUE TOTAL FRENTE AO ESTÍMULO ANTIGÊNICO TPP, AO LONGO DA INFECÇÃO.

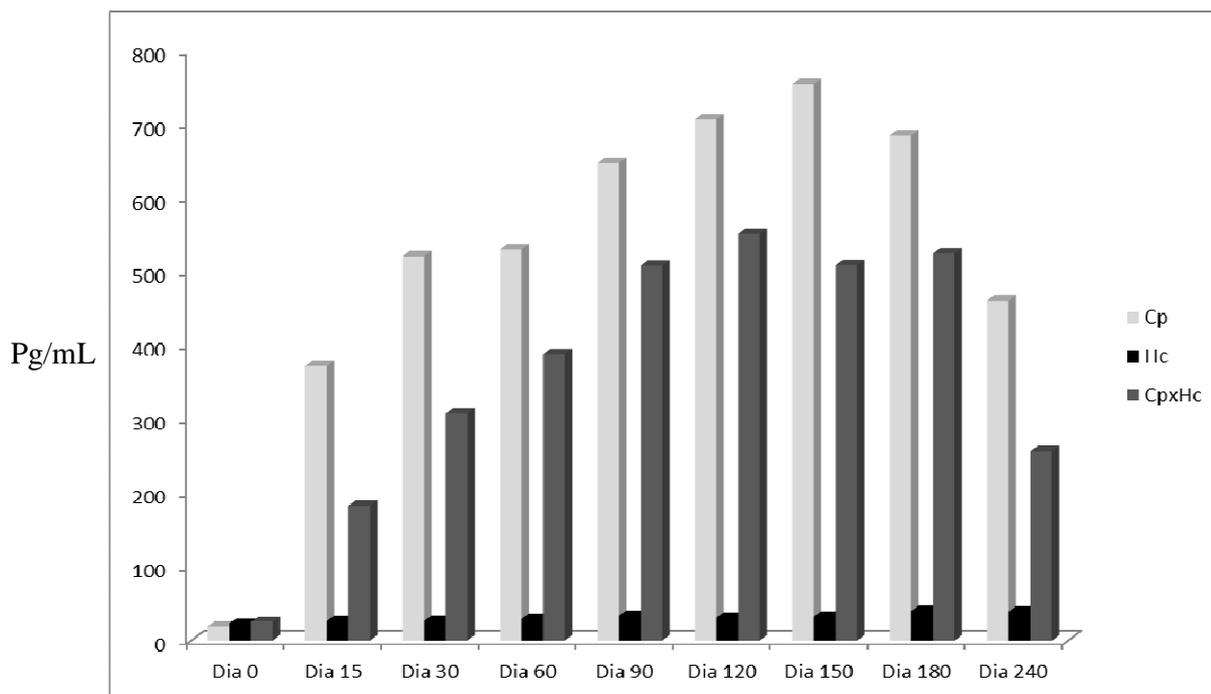


Fig. 6 – Produção *in vitro* de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por células do sangue periférico após estímulo com 40ug de da fração TPP em ovinos infectados com a linhagem virulenta, ao longo de 240 dias de acompanhamento. Grupo Cp (n=5): Animais infectados com  $4,4 \times 10^7$  CFU, Grupo Cp x Hc (n=5): Animais co-infectados com *C. pseudotuberculosis*  $4,4 \times 10^7$  CFU e *H. contortus* (12 mil L3) e Grupo Hc (n=5): Animais infectados com *H. contortus* (12 mil L3).

No tempo zero todos os grupos apresentaram níveis extremamente baixos como era esperado. Desde o dia 15 os grupos Cp e CpxHc apresentaram grande

aumento na expressão de IFN-  $\gamma$  quando comparados ao tempo zero ( $p < 0,001$ ) até o último ponto experimental.

Os valores de IFN-  $\gamma$  expressados pelo grupo infectado com *C. pseudotuberculosis* nos tempos de 60, 90, 120, 150 e 180 dias foram superiores aos 15 dias ( $p < 0,001$ ). A partir deste ponto a produção declina. Esta produção crescente também apresentou diferenças estatísticas quando compara-se 90 ( $p < 0,01$ ), 120, 150 e 180 dias ( $p < 0,001$ ) com 60 dias pós-inóculo.

Aos 90 dias de infecção, a produção desta citocina foi significativamente mais elevada que 15 ( $p < 0,001$ ), 30 ( $p < 0,01$ ) e 60 dias ( $p < 0,05$ ). O pico observado aos 150 dias foi superior a produção correspondente a 90 dias de infecção ( $p < 0,05$ ) e o oposto foi visto com a diminuição significativa aos 240 dias quando comparado ao tempo de 90 dias ( $p < 0,001$ ).

A produção da citocina em estudo nos tempos de 120, 150 e 180 dias foi superior aos tempos anteriores de 15, 30, 60 dias, bem como ao último tempo experimental ( $p < 0,001$ ).

Na análise entre os tempos, o grupo Cp x Hc apresentou diferenças estatisticamente significantes entre o 15º dia e os dias 60, 90, 120, 150 e 180 ( $p < 0,001$ ).

Observou-se diferenças também entre 60 dias de infecção e 120, 180 e 240 ( $p < 0,001$ ). Os tempos de 90, 120, 150 e 180 dias apresentaram diferenças mensuráveis quando comparados aos 30 e 240 dias ( $p < 0,001$ ).

Em todos os pontos experimentais pós-infecção, os animais infectados com *C. pseudotuberculosis* apresentaram maior expressão desta citocina em relação aos animais co-infectados ( $p < 0,001$ ), 90 dias ( $p < 0,05$ ), 180 dias ( $p < 0,01$ ).

O grupo Hc, livre de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se manteve em níveis basais ao longo de todo experimento.

Os valores referentes aos controles negativos, que não receberam estímulo e aos controles positivos, estimulados com o mitógeno PWM funcionaram a contento, garantindo a qualidade das culturas de sangue periférico. No entanto não foram incluídos nos gráficos, pois títulos discrepantes comprometeriam a interpretação clara dos dados.

### 6.7. PRODUÇÃO DE IgG TOTAL PELOS OVINOS AO LONGO DA INFECÇÃO.

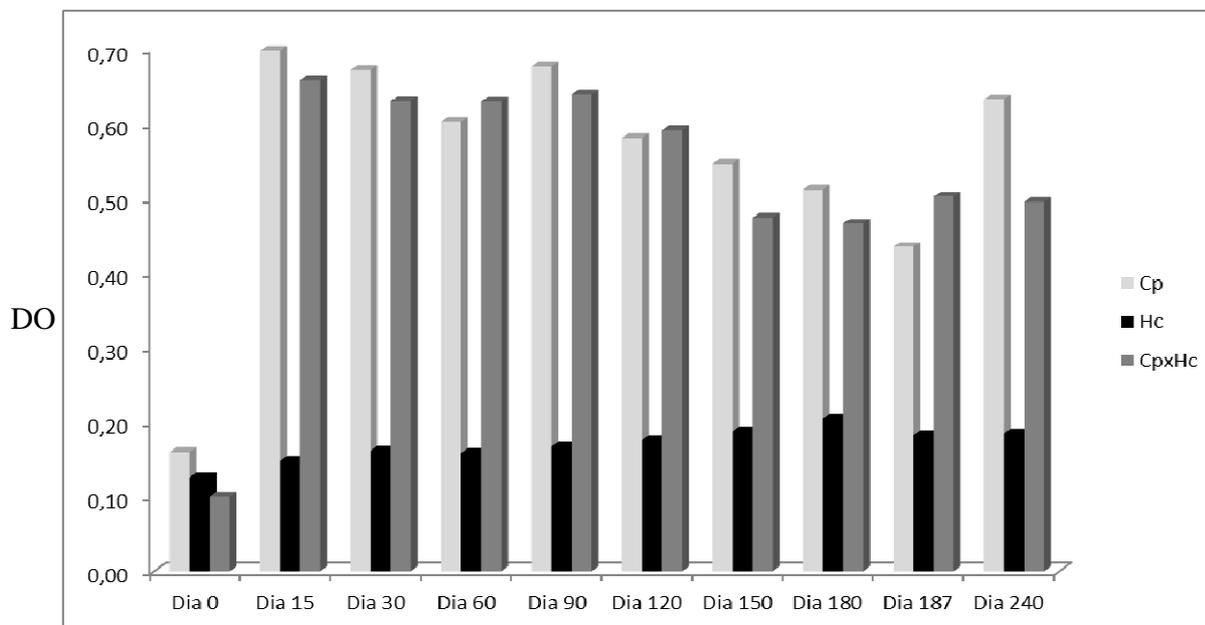


Fig. 7 – Cinética da produção de IgG total específica anti-*C. pseudotuberculosis* em ovinos ao longo de 240 dias de observação. Grupo Cp (n=5): Infectados com a linhagem selvagem  $4,4 \times 10^7$  CFU, Grupo Hc (n=5): Infectados com 12 mil larvas L3 e Grupo Cp x Hc (n=5): Co-infetados com *C. pseudotuberculosis* ( $4,4 \times 10^7$  CFU) e *H. contortus* (12 mil L3). ELISA Indireto sensibilizado com antígeno BHI. Ponto de corte de 0,250.

As D.Os no dia zero se apresentaram baixas para todos os grupos, sendo que os grupos Cp e Cp x Hc aumentaram expressivamente aos 15 dias de infecção e mantiveram seus valores elevados até o último ponto experimental, em relação ao tempo zero ( $p < 0,001$ ).

Os dois grupos infectados com *C. pseudotuberculosis*, apresentaram produção de IgG muito similares em todos os tempos experimentais. Mas, ambos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo Hc, em todos os tempos pós-inoculação ( $p < 0,001$ ).

Na análise entre os tempos, observou-se diferenças no grupo Cp aos 15, 30 e 90 dias quando comparados ao tempo zero e no grupo Hc entre os dias zero e 180 ( $p < 0,05$ ).

#### **6.8. ACOMPANHAMENTO DA INFECÇÃO PELO *H. contortus***

Os resultados da contagem de ovos liberados nas fezes dos animais do grupo Cp, se comportou de maneira semelhante ao primeiro experimento (livre de *Haemonchus*), enquanto os animais experimentalmente infectados com *H. contortus* apresentaram valores semelhantes ao grupo de Co-infecção, ambos acima de 700 ovos por grama de fezes.

#### **6.9. WESTERN BLOTTING**

Os resultados obtidos através da transferência eletroforética do gel de poliacrilamida para o papel de nitrocelulose, seguida de reação imunoenzimática se encontram na figura 8. O padrão de peso molecular utilizado consiste de valores que

variam de 10 a 220 KDa e a partir deste, calculou-se as três bandas imunorreativas com pesos de 30, 72 e 120KDa.

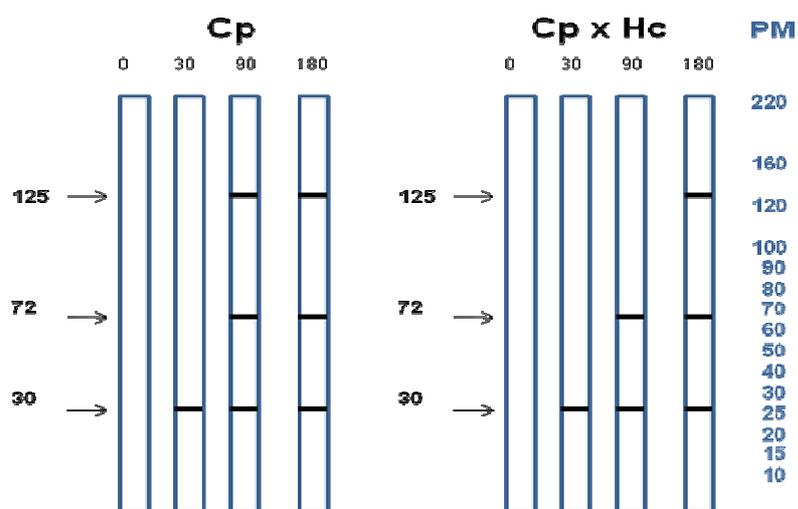


Fig. 8 – *Western Blotting* das amostras de soro dos animais infectados com *C. pseudotuberculosis* ( $4,4 \times 10^7$  CFU) e co-infectados (Cp  $4,4 \times 10^7$  CFU/Hc 12 mil L3, dos tempos 0, 30, 90, 180 de infecção, realizado com antígeno TPP de uma linhagem virulenta. PM corresponde ao padrão de peso molecular que varia de 10 a 220 KDa.

## 7. DISCUSSÃO

A importância do IFN $\gamma$  na resposta imune celular contra a progressão clínica da doença já foi anteriormente descrita (LAN *et al.*, 1998 e PÉPIN *et al.*, 1997). Em um estudo utilizando a dosagem de IFN $\gamma$  como um possível marcador para o diagnóstico da Linfadenite Caseosa em caprinos e ovinos, pesquisadores do nosso grupo também encontraram associação entre altos níveis de IFN $\gamma$  em animais com granulomas (REBOUÇAS *et al.*, 2011). O IFN $\gamma$  também atua ativando principalmente os macrófagos e induzindo a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos - MHC de classe I e II, sendo a sua produção estimulada principalmente pela IL-12 (ALLIE *et al.*, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011, PERRY *et al.*, 1997; NOLL, *et al.*, 1996).

### 7.1. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE *IN VITRO* DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO

Paule *et al.* (2003), mostraram a produção de IFN $\gamma$  em caprinos utilizando antígenos secretados. Logan *et al.* (2005) demonstraram em bovinos infectados com *M. bovis*, que altas concentrações de IFN $\gamma$  indicam momentos ou períodos de proliferação do microrganismo.

Resultados preliminares mostraram que células dos camundongos infectados com a linhagem selvagem, sob a ação dos estímulos antigênicos em estudo, apresentaram um pico com 15 dias de infecção para as citocinas  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$ , IL-10 e IL-4, decrescendo aos 35 dias. Nos animais deste grupo, os antígenos secretados, total e fracionado, apresentaram resultados muito semelhantes quanto ao padrão e quantidade de citocinas produzidas “*in vitro*”, havendo diferenças estatisticamente significantes somente nos níveis de  $TNF\alpha$  e IL-4 produzidos, sendo que a fração Q5 induziu maior produção de ambas as citocinas. Este grupo experimental desenvolveu a doença, com formação de granulomas, perda de peso e alto índice de mortalidade. Esta forte resposta inflamatória inicial observada nesses camundongos foi evidenciada pela elevada produção de  $TNF\alpha$ , sob a ação dos dois estímulos. (RODRIGUES, 2009)

O antígeno Q5 induziu maior expressão da citocina  $IFN\gamma$  nos animais inoculados com a cepa selvagem de *C. pseudotuberculosis* quando comparado aos animais co-infectados em todos os tempos pós-infecção sugerindo uma modulação da resposta imune pelo *H. contortus*. Apesar desta diferença estar nitidamente evidente no gráfico 2, diferença estatisticamente significativa só foi observada aos 30 dias de infecção, provavelmente devido ao desvio padrão nestes grupos, nos demais tempos experimentais.

Esta ampla variabilidade de resposta celular de  $IFN\gamma$  é observada nos animais experimentais em cada ponto de coleta e ao longo do período experimental. Conforme os trabalhos de Prescott e colaboradores (2002), bem como de Sunil e colaboradores (2008), nesta ampla variabilidade individual dos valores de  $IFN\gamma$

produzido *in vitro* por células sanguíneas, alguns animais elevam seus valores enquanto que outros decrescem os valores em um mesmo ponto de coleta; além de ocorrerem discrepâncias entre os valores de diferentes animais inoculados num mesmo dia e com a mesma dose bacteriana, as flutuações ocorrem também ao longo da própria cinética de resposta de cada indivíduo. Estas flutuações ocorreriam segundo estes autores, devido a fatores como a fase da doença, severidade da infecção, grau de disseminação bacteriana no organismo, ao status de saúde do animal, bem como a heterogeneidade genética.

Considerando que animais geneticamente resistentes à infecção pelo *H. contortus*, apresentam uma resposta imune do tipo Th2 intensa, podendo atuar sinergicamente com os anticorpos, assim contribuindo para expressão da imunidade adquirida no hospedeiro (GILL *et al.*, 2000; PENÃ *et al.*, 2006), os achados no presente trabalho, apesar da já mencionada limitação pelo tamanho da amostra (e conseqüente menor expressão do tratamento estatístico) sugerem que esta resposta imune predominantemente Th2 esteja envolvida na modulação negativa na produção de IFN $\gamma$ .

Adicionalmente a esta imunidade humoral intensa, caracterizada pela formação de anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE, sendo essa última de grande importância na defesa anti-helmíntica, observa-se também mecanismos de imunidade celular que certamente também contribuem na resistência contra este helminto (WATSON, 1986; MILLER, 1996). Embora a resposta anti-helmíntica não tenha sido avaliada neste trabalho, fica claro que tal resposta pode ser montada,

tendo em vista os mensuráveis níveis de IFN $\gamma$  observados nos grupos de co-infecção.

A busca por antígenos imunodominantes de *C. pseudotuberculosis* vem sendo constantemente realizada por diversos grupos de pesquisadores do mundo. Neste sentido, comumente se constata na literatura a utilização de caldo BHI (Brain heart infusion) para o cultivo e obtenção de antígenos secretados pela bactéria (BINNS *et al.*, 2007; MOURA-COSTA *et al.*, 2008). Antígenos secretados são considerados até mais eficazes que os antígenos somáticos para compor uma vacina contra bactérias intracelulares (KAUFMANN e HESS, 1999).

Ao analisar a produção da citocina estudada, diante do estímulo do antígeno secretado total (TPP), a modulação imune foi evidenciada em todos os tempos pós-inoculação, com diferenças estatísticas robustas, no grupo de co-infecção.

O antígeno TPP revelou altos níveis de interferon-gama, especialmente no grupo Cp, confirmando os achados de Meyer e colaboradores (2005), onde verificaram altos índices de produção de IFN- $\gamma$  pela indução do antígeno secretado TPP, e baixa produção quando os leucócitos foram estimulados com antígeno somático.

Vale (2005) cujos preparados antigênicos, somático e secretado, estimularam *in vitro* a produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 em altas concentrações, que são citocinas do perfil Th1, enquanto que IL-4, citocina típica do padrão Th2, foi produzida em baixas concentrações em resposta a tais estímulos antigênicos. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, que demonstram ser o perfil de resposta

predominantemente Th1, aquele responsável pela eliminação de bactérias intracelulares (LIM *et al.*, 2004; FORTUNE *et al.*, 2004).

Em relação à resposta imune celular observada, estudos anteriores já haviam demonstrado em modelo murino que o perfil de resposta celular Th1, com abundância de linfócitos CD4<sup>+</sup> secretantes de IFN-gama, é capaz de conferir imunidade protetora contra infecções secundárias por *C. pseudotuberculosis* (Lan *et al.*, 1999a). Sugere-se que esta participação do IFN-gama na proteção contra o microrganismo também ocorra em caprinos (PAULE *et al.*, 2003) e ovinos (PRESCOTT *et al.*, 2002; SUNIL *et al.*, 2008).

Por apresentar um grande espectro de proteínas antigênicas secretadas e somáticas (PAULE *et al.*, 2004a) e ser um patógeno intracelular facultativo de fagócitos mononucleares (BATEY, 1986), a elaboração de uma resposta imune envolve componentes celulares e humorais (ELLIS *et al.*, 1990; PAULE *et al.*, 2003). Alguns estudos indicam que a resposta imune celular do tipo Th1 apresenta uma maior capacidade protetora para ovinos e caprinos em relação à resposta Th2 (SIMMONS *et al.*, 1998; ALVES e OLANDER, 1999).

Considerando que a estimulação com os antígenos secretados foram realizados em experimentos distintos, sendo indivíduos e doses de infecção diferentes, não foi possível comparar o efeito indutor da resposta celular através de ferramentas da estatística.

Entretanto os níveis elevados de IFN- $\gamma$  sob estímulo de TPP se mantiveram crescentes até os 180 de infecção, e após este tempo mesmo com decréscimo, apresentou produção expressiva. Já a fração Q5, apresentou produção mais discreta

e com queda mais precoce, ainda que o acompanhamento tenha ocorrido apenas até os 90 dias.

Trabalhos anteriores têm mostrado que para o controle de outras infecções persistentes e por microrganismos de parasitismo intracelular, similares à causada por *C. pseudotuberculosis*, células T regulatórias produzem tanto IFN- $\gamma$  quanto IL-10 estimuladas pela IL-12 (TRINCHIERI, 2001; POHL-KOPPE *et al.*, 1998).

A produção de interferon-gama foi evidenciada precocemente, aos 15 dias após infecção. Trabalhos anteriores indicam que níveis significativamente elevados desta citocina já podem ser detectados a partir de 35 dias após a infecção (PRESCOTT *et al.*, 2002; SUNIL *et al.*, 2008). Contudo, estes trabalhos, ambos do mesmo grupo de pesquisa canadense, utilizaram uma dose de  $4 \times 10^7$  células de *C. pseudotuberculosis* para a infecção experimental, além de utilizarem estímulos antigênicos baseados em lisados bacterianos (50  $\mu$ g) e células bacterianas inativadas ( $1,5 \times 10^7$  células) para induzir a resposta celular *in vitro*. Possivelmente, as diferenças de resultados podem estar associadas às diferenças de protocolos experimentais.

Baseado em todas as evidências revisadas neste estudo, pode-se entender que o efeito imunomodulador induzido pela presença da parasitose, pode ser uma das explicações para o aumento da mortalidade nos pequenos ruminantes co-infectados, considerando que além da alteração do perfil imunológico Th1 predominante protetor para o animal, existe a própria debilidade do animal quando acometido por ambas enfermidades. Este parasita é o maior responsável pelo rápido desenvolvimento da resistência em nematódeos de pequenos ruminantes

(SANGSTER, 2001) provavelmente devido ao seu alto potencial biótico (ECHEVARRIA E TRINDADE, 1989), grande variabilidade genética e por albergar o alelo que causa a diminuição da susceptibilidade a uma droga (BLACKHALL et. al., 1998).

## 7.2. A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS AO LONGO DA IMUNIZAÇÃO

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

A cinética de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* específica do experimento I demonstrou nítida produção desta imunoglobulina nos grupos Cp ( $p < 0,01$ ) e de co-infecção em relação ao tempo zero, a partir da infecção. Devido a heterogeneidade entre indivíduos do mesmo grupo já discutida nesta tese é que o grupo composto por animais co-infectados só apresentou diferença estatisticamente significativa no tempo de 60 dias, quando comparado ao tempo zero.

O pico na expressão de IFN- $\gamma$  sob os estímulos de TPP e Q5 teve início aos 15 dias pós-inoculação, assim como foi visto na produção de IgG. 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).

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

No experimento I os animais co-infectados apresentaram títulos de IgG superiores aos animais infectados apenas com *C. pseudotuberculosis* aos 30, 60 ( $p < 0,01$ ) e 90 dias de infecção, momentos em que os níveis ultrapassaram o ponto de corte, sugerindo que a resposta anti-helmíntica Th2 intensa influenciou na produção desta imunoglobulina no grupo Cp x Hc, principalmente no 60° dia.

Já no segundo experimento a produção de anticorpos foi bastante elevada nos grupos Cp e Cp x Hc desde o 15° dia de infecção, no entanto sem diferença entre estes grupos, em todos os tempos estudados.

As bandas evidenciadas no blot não alteraram a interpretação da avaliação da resposta por anticorpos, o que concorda com os resultados de ELISA, onde não são observadas diferenças significativas entre os valores de densidade ótica obtidos para a IgG sérica específica para Cp nos dois principais grupos experimentais.

Elevados títulos de IgG constatados no segundo experimento estão de acordo com os achados encontrados por Cerqueira (2006), que estudando a avaliação da resposta humoral em caprinos infectados com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* através de diferentes testes ELISA indiretos, observou que a

linhagem atenuada e a selvagem apresentaram uma resposta humoral elevada quando comparadas pelo ELISA utilizando TPP como antígeno.

Em contrapartida, quando comparadas pelo teste ELISA com a fração Q5 a linhagem selvagem desenvolveu um perfil de resposta bem superior, talvez por se tratar de um antígeno mais puro comparado com o antígeno secretado total. Apesar do ELISA com antígeno purificado diferenciar os animais infectados com as diferentes linhagens bacterianas (CERQUEIRA, 2006), o ELISA com antígeno secretado total também apresentou expressiva capacidade de discriminar os grupos compostos por animais infectados, corroborando com os resultados obtidos por Carminati (2005).

As diferenças das respostas imunes, celular e humoral existentes entre esses autores se devem, provavelmente, às diferentes concentrações e linhagens bacterianas utilizadas na infecção.

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

## 8. CONCLUSÕES

- ✓ A fração secretada Q5 e o antígeno TPP possuem estruturas antigênicas responsáveis pelo reconhecimento e ativação de componentes celulares e humorais da resposta imune.
- ✓ Em ambos os experimentos, a infecção de ovinos apenas com a linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi capaz de induzir uma expressiva tendência de aumento da expressão *in vitro* de IFN- $\gamma$  quando comparada com o efeito induzido nas mesmas condições nos animais co-infectados.
- ✓ Apesar desta modulação percebida na resposta imune celular através da avaliação da expressão de IFN- $\gamma$ , o grupo co-infecção apresentou níveis satisfatórios desta citocina após infecção.
- ✓ Apesar do tamanho amostral não permitir confirmação estatística em todos os pontos observados, sob estímulo de Q5, este resultado sugere uma possível modulação negativa da resposta imune promovida pelo parasita *H. contortus* sobre a resposta Th1 contra este microrganismo.

- ✓ No primeiro experimento, o grupo dos animais co-infectados apresentou diferença estatisticamente significativa na resposta por IgG específica contra *C. pseudotuberculosis* no 60º dia de infecção, com níveis mais altos que aqueles apenas infectados com este microrganismo, o que sugere uma mais forte ativação Th2 neste grupo.

## 9. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

- Para a realização do presente trabalho padronizou-se, com muito bons resultados, a utilização da fração antigênica Q5 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como estimuladora *in vitro* da produção de interferon- $\gamma$ , a partir de culturas de células do sangue periférico ovino.

- A demonstração de que ocorre modulação negativa da resposta Th1 pela intensa estimulação Th2 induzida pela infecção pelo *Haemonchus contortus*, aponta a necessidade de se identificar nestes pequenos ruminantes, como prováveis alvos, a possível ação de moléculas envolvidas neste processo, como a já identificada Ym1 em outros modelos experimentais.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª ed. São Paulo: Elsevier. p. 251, 2012.

ALLIE, N., KEETON, R., COURT, N., ABEL, B., FICK, L., VASSEUR, V., VACHER, R., OLLEROS, M. L., DRUTSKAYA, M. S., GULER, R., NEDOSPASOV, S. A., GARCIA, I., RYFFEL, B., QUESNIAUX, V. F. J., JACOBS, M., Limited role for lymphotoxin  $\alpha$  in the host immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 185, 4292-4301, 2010.

ALLONBY, E.W.; URQUHART, G.M. The epidemiology and pathogenic significance of haemonchosis in a Merino flock in East Africa. *Vet. Parasitol.*, v.1, p.129-143,1975.

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

ANCO - Agência de notícias de caprinos e ovinos. Bahia organiza Câmara Setorial da Carne. 2010. Disponível em: <<http://www.anco.cnpc.embrapa.br/index.php>>. Acesso em: 09/10/2010.

ANDERSEN, P., ASKGAARD, D., LJUNGQVIST, L., BENTZON, M.W., HERON, I. T-

cell Proliferative Response to Antigens Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity, v. 59, p. 1558-1563, 1991.

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

AQUINO DE SÁ. Distribution of *PLD* and *FagA, B, C* and *D* genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. Genet Mol Biol. 2013

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

AYERS, L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. J. Am. Vet. Med. Assoc., v.171, n.12, p.1241-1251, 1977.

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

BASTOS, B.L. et al., *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological Responses in Animal Models and Zoonotic Potential, *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 2012

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

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

BELCHIOR, S.E.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; JODOR, N.; JENSEN, O. Actualizacion sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Rev Vet Argent.*, v. 23, p. 258-8, 2006.

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

BILLINGTON, S. J.; ESMAY, P. A.; SONGER, J. G.; JOST, B. H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *F. Microbiol. Lett.*, v .208, p.41-45, 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.* 23:169-179, 2007.

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

BLACKHALL, W.J. et al. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. *Experimental Parasitology*, v.190, p.42-48, 1998.

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.* v. 56, p. 299-310, 1997.

BRANDÃO AP, OLIVEIRA FS, CARVALHO NB, VIEIRA LQ, AZEVEDO V, MACEDO GC, OLIVEIRA SC. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN- $\gamma$  knockout than IL-12/ $\beta$ 2-microglobulin double-deficient mice. *Clin Dev Immunol.* 2012:589494, 2012.

BROGDEN K.A., CUTLIP R.C., LEHMKUHL H.D. Response of sheep after localized deposition of lipopolysaccharide in the lung. *Exp. Lung. Res.* 7. 1984.

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

BROWN, C.C.; OLANDER, H.J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. *Vet. Bulletin.*, v.57, n.1, p.1-5, 1987.

BURRELL, D.H. Non-specific agglutination of *C. ovis* by precolostral and young lamb sera. *Res. Vet. Sci.* v.25, p. 373-375, 1978.

BURRELL, D.H. Non-specific agglutination of *C. ovis* by precolostral and young lamb sera. *Res. Vet. Sci.* v.25, p. 373-375, 1978.

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

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

BURRELLS, C.; INGLIS, N.F.; DAVIES, R.C.; SHARP, J.M. Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and

*paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 45, p. 311-320, 1995.

CAMERON C.M., MINNAR J. L., ENGELBREGHT, M. M., PURDON, M R. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. Onderstepoort J. Vet. Res., v.39, p.11-24, 1972.

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

CARMINATI, R. Estudo da sensibilidade e especificidade de quatro testes Elisa e utilização da técnica de PCR para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia, 2005.

CARNE, H.R. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents. Australian Veterinary Journal, v. 8, n. 2, p. 42-47, Apr., 1932.

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

CERQUEIRA, R.B. Avaliação da resposta humoral de caprinos infectados com duas linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através de diferentes testes

ELISA Indiretos. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia, 2006.

CHARLES, T.P. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.30, p.335-343, 1989.

COLLIN M & FISCHETTI VA. A novel secreted endoglycosidase from *Enterococcus faecalis* with activity on human immunoglobulin G and ribonuclease B. *J Biol Chem* 279: 22558–22570, 2004.

CORRÊA, FLORES. F, SCHNEIDERS. G, PEREIRA.L, BRITO.B, LOVATO. M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2014

CORRÊA, W. M., CORRÊA, C. N. M.; *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro. 147-149, 1992.

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

COSTA FILHO, G.A. Particularidades da Linfadenite Caseosa dos caprinos em Pernambuco e no Nordeste. Anais da ESV – Univ. Feder. Rural de Pernambuco, v.1, p.9-23, 1974.

D'AFONSECA, V., MORAES, P. M. R. O., PACHECO, L.G.C., MEYER, R., Portela, R.W., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. Genetics and Molecular Research. , v.7, p.252 - 260, 2008.

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

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

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. 2006. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet. Res., v. 37, p. 201–218, 2006.

DROPPA-ALMEIDA, D. ; LORDELLO, W. ; Silva, J. W. R. ; GANDA, I. S. ; BORSUK, S. ; SIMIONATO, S. ; Lima-Verde, I.B. ; Azevedo, V. ; Meyer, R. ; Padilha, F. .  
Potencial Immunologic action of recombinant cp40 protein from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: World Congress of Biotechnology, 2013.

ECHEVARRIA, F.A.M.; TRINDADE, G.N.P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. *Veterinary Record*, v.124, p.147-148, 1989.

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

ELLIS, J. A.; LAIRMORE, M.D.; O´TOOLE, D.T.; CAMPOS, M. Differential induction of tumor necrosis factor alpha in ovine pulmonary alveolar macrophages following infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella haemolytica*, or Lentiviruses. *Infection and Immunity*, v. 59, n. 9, p. 3254-3260, 1991.

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

FAKAE, B.B.;CHIEJINA, S.N.; BEHNKE, J.M.; EZEOKONKWO, R.C.; NNADI, P.A.; ONYENWE, W.I.; GILBERT, F.S.; WAKELIN, D. The response of Nigerian West

African Dwarf goats to experimental infections with *Haemonchus contortus*.  
Veterinary Science, v. 66, p.147-158, 1999.

FIGUEIREO, E; SHELTON, M&PANT, K. Goat Skins. In:Proceedings of the III  
International Conference Goat production diseases. 1982

FIORENTINO DF<sup>1</sup>, BOND MW, MOSMANN TR. Two types of mouse T helper cell. IV.  
Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp.  
Med. 1989

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

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

FRAGA,R. Avaliação de aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção  
com linhagem selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em  
diferentes linhagens de camundongos, tese de doutorado, 2012.

GILL, H.S.; ALTMANN, K.; CROSS, M.L.; HUSBAND, A.J. Induction of T helper 1 and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology*, v.99, p.458-463, 2000.

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

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

GUIMARÃES, A.S., CARMO, F.B., PAULETTI, R.B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A.P., HEINEMANN, M.B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A.M.G. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and control. *The IIOAB Journal*, v. 2, 33-43, 2011.

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

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

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

HORWITZ MA, HARTH G, DILLON BJ, MASLESA-GALIC S. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 97:13853-58, 2000.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastro-intestinal parasitism. *Int J for Parasitol.*, 31 (3), 231–244, 2001.

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

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

KAUFMANN, S.H. Immunity to intracellular bacteria. *Annual Review of Immunology*, 11, 129-163. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001021, 1993.

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

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

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

LAN, D.T.B.; TANIGUHI, 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.

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

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

LOWRY, O. H. Protein mensurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., v.193, p.265- 275, 1952.

MACRAE, J.C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. Proc. Nutr. Soc., v.52, p.12-130, 1993.

McINTYRE, T.M.; KLINMAN, D.R.; ROTHMAN, P. et al. Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. J. Exp Med. V.177, p.1031-1037, 1993.

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

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

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

MEYER, R.; REGIS, L.; 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.

MILLER, H.R.P. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, can it be harnessed? International Journal for Parasitology, v.26, n.8/9, p.801-811, 1996.

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

MOHAN, V.P.; SCANGA, C.A.; YU, K.; SCOTT, H.M.; TANAKA, K.E.; TSANG, E.; TSAI, M.C.; FLYNN, J.L.; CHAN, J. Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Host Immune Response in Chronic Persistent Tuberculosis: Possible Role for Limiting Pathology. Infection and Immunity, v. 69, n. 3, p. 1847-1855, 2001.

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

MOORE, R.J.; ROTHEL, L.; KRYWULT, A.J.; LUND, K.L.;HODGSON, A.L.M. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine*, v. 18, p. 487-497, 2001.

MORTENSEN, L.L., WILLIAMSON, L.H., TERRILL, T.H. et al. Evaluation of revalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 23, p. 495–500, 2003.

MOURA-COSTA L.F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, v.1, n.1, p.105-115, 2002.

MOURA-COSTA L.F., BAHIA R.C., CARMINATI R., VALE V.L., PAULE B.J., PORTELA R.W., FREIRE S.M., NASCIMENTO I., SCHAEER R., BARRETO L.M. & 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, M.D.; CÂMARA, J.Q.; ROCHA, J.V.N.; MARTINEZ, T.C.N. Linfadenite caseosa dos caprinos no Estado da Bahia – Distribuição geográfica da doença. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador*, n. 12, v.1, p.1-7, 1973.

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.

MUÑOZ-GUZMÁN, M.A.; CUÉLLAR-ORDAZ, J.A.; VALDIVIA-ANDA, G.; BUENDÍA-JIMÉNEZ, J.A.; ALBA-HURTADO, F. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. Canadian Journal of Animal Science, v.86, p.363-371, 2006.

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

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

NASCIMENTO, D.L. Soroepidemiologia da Linfadenite Caseosa em ovinos de raça definida do estado da Bahia e correlação com a ocorrência de outras doenças infecciosas e com aspectos zootécnicos. Salvador, Bahia, 91p, Dissertação

(Mestrado em Ciência Animal Nos Trópicos) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2012.

NOLL A, AUTENRIETH IB. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. *Infect Immun.* 64:2955-61, 1996.

NORTH, R. J. The concept of the activated macrophage. *The Journal of Immunology*, v. 121, p. 806-809, 1978.

OLIVEIRA NETO. Avaliação da influência do óxido nítrico durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino. Dissertação de Mestrado. PIOS, 2011.

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., SLADE, S. *et al.* A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiology*. 2011

PASCUAL, C.; LAWSON, P.A.; FARROW, J.A.; GIMENEZ, M.N.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene

sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 45, p. 724-728, 1995.

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

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

PATON, M.W.; WALKER, S.B.; ROSE, I.R.; WATT, G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.*, v.81, p.91-95, 2003.

PAULE, B.J.A., MEYER, R., MOURA-COSTA, L.F., BAHIA, R.C., CARMINATI, R., REGIS, L.F., VALE, V.L.C., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, v. 34, p. 311-316, 2004a.

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

PENÃ, M.T.; MILLER, J.E.; HOROHOV, D.W. Effect of CD4+ T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. Vet. Parasitol., v.138, p.240-246, 2006.

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

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

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

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

PRESCOTT, J.F., MENZIES, P.I., HWANG, Y.T. An interferon-gama assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. *Veterinary Microbiology*, v. 88, p. 287–297, 2002.

RADOSTITS, O. M. et al. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RAHMAN, W.A. AND COLLINS, G.H. The establishment and development of *Haemonchus contortus* in goats, *Brit. Vet. J.* 146(6): 543-550, 1990.

REBOUÇAS, M.F., PORTELA, R.W., LIMA, D.D., LOUREIRO, D., BASTOS, B.L., MOURA-COSTA, L.F., VALE, V.L., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific interferon-gama production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 23, p. 213-220, 2011.

RIBEIRO, O.C.; SILVA, J.A.H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.10, n.2, p.23-24,1988.

RODRIGUES, G.C. Papel de antígenos secretados de uma linhagem atenuada de *corynebacterium pseudotuberculosis* na indução de resposta imune em camundongos-dissertação de mestrado, 2009.

ROJAS, M.; OLIVIER, M.; GROS, P.; BARRERA, L.F.; GARCIA, L.F. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 162, p. 6122-6131, 1999.

ROWE, J.B.; NOLAN, J.V.; DE CHANEET, G.; TELENI, E. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *Br. J. Nutr.* v.59, p.125-139, 1988.

RUIZ JC, et. Al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*. Apr 18;6(4):e18551, 2011.

SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, v.98, p. 89-109, 2001.

SANTOS AR, CARNEIRO A, GALA-GARCÍA A, et al. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* in silico predicted pan-exoproteome. *BMC Genomics* 2012.

SIMMONS C. P.; DUNSTAN S. I. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.*, v.66, n.2, p.474-479, 1998.

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

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

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

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

SUNIL, V., P.I.MENZIES, P.E. SHEWEN, J.F. PRESCOTT. Performance of a whole blood interferon-gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. Veterinary microbiology, v. 3846, 2008.

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

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

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

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

TROST E. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC Genomics*, 2011.

UNANIAN, M.M.; FELICIANO-SILVA, A.E.D.; PANT, K.P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v. 17, p. 57-62, 1985.

VALE, V. L. C. Avaliação de aspectos da resposta imune de camundongos contra *C. pseudotuberculosis*. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em imunologia – UFBA, 2005.

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

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

WALKER, J.; JACKSON, H.J.; EGGLETON, D.G.; MEEUSEN, E.N.T.; WILSON, M.J. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that PROTECTS SHEEP AGAINST CASEOUS LYMPHADENITIS, INFECTION AND IMMUNITY, V. 62, N. 6, p. 2562-2567, 1994.

WATSON, T.G. Immunity to gastrointestinal nematode parasites in domestic stock with particular reference to sheep: A review. Proceedings of the New Zeland Society of Animal Production, v.46, p.15-22, 1986.

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

WILSON, M.J., BRANDON, M.R. AND WALKER, J. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infection and immunity, Jan. 1995, p. 206–211.

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

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

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

## 11. APÊNDICE

Apresenta-se a seguir um artigo com os resultados obtidos no presente trabalho de Tese, no momento sendo traduzido para ser submetido à publicação na revista *Veterinary Research* (Artigo 1) e uma revisão sobre a resposta imune induzida pelo helminto *Haemonchus contortus* e a regulação negativa sobre a resposta Th1, conseqüente pela co-infecção onde um dos patógenos é um helminto. Esta revisão está sendo traduzida e formatada para ser submetida à publicação no periódico *Veterinary Record*.

## ARTIGO 1

### Aspectos da resposta imune em ovinos experimentalmente co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus*.

Gabriele Rodrigues<sup>1</sup>, Daniele Dantas<sup>1</sup>, Marcos Silva<sup>2</sup>, Bruno Bastos<sup>3</sup>, José Tadeu Reynal<sup>1</sup> e Roberto Meyer<sup>1</sup>

#### Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível regulação negativa induzida por mecanismos Th2, desencadeados pelo helminto *Haemonchus contortus*, sobre a resposta por células do perfil Th1, importante para conter a infecção pelo cocobacilo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, na infecção ovina concomitante por estes dois parasitas. Para tanto, avaliou-se a resposta Th1 em duas diferentes condições de infecção experimental, utilizando-se como indicador a produção *in vitro* de interferon  $\gamma$ , que é a citocina mais típica do seu perfil, a partir de culturas de células do sangue periférico de ovinos co-infectados com estes dois parasitas, comparando-se com a sua produção, nas mesmas condições, em animais apenas infectados com a referida bactéria e usando-se como estímulo dois preparados antigênicos com diferentes graus de pureza. Os resultados evidenciaram uma tendência de redução na produção desta citocina nos animais co-infectados em relação àqueles infectados apenas com *Corynebacterium pseudotuberculosis*, nos dois protocolos experimentais. Quanto à resposta por anticorpos da classe IgG específicos contra esta bactéria, avaliada pelo teste munoenimático ELISA e por *western blot*, não se observou diferenças entre os grupos infectados apenas com o bacilo ou com a dupla infecção.

---

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade do Estado da Bahia

<sup>3</sup> Instituto Multidisciplinar em Saúde da UFBA

Endereço dos autores para correspondência:

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Avenida Reitor

Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brazil. CEP: 40.110-100

Phone: 55-71- 3332-3341

Fax: 55-71-3235-9682

e-mail: [rmeyer@ufba.br](mailto:rmeyer@ufba.br); (R. Meyer)

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemonchus contortus*, co-infecção, resposta imune Th1-Th2, regulação negativa.

## Introdução

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa crônica causada por um cocobacilo Gram+, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete principalmente pequenos ruminantes. Apresenta alta prevalência em diversas regiões do Brasil, como demonstrado através de estudos soro-epidemiológicos (MEYER, 2003; BASTOS *et al*, 2011; GUIMARÃES *et al*, 2011). Embora nestes animais a resposta por anticorpos seja intensamente dirigida contra a fosfolipase D, uma exotoxina hemolítica e importante fator de virulência deste microrganismo (JOLLY, 1965; BROWN e OLANDER, 1987), por se tratar de uma bactéria intracelular facultativa, a resposta imune celular é, sem dúvida, essencial para conter a infecção no interior de macrófagos (FRAGA, 2012, SOUZA, 2014). *Haemonchus contortus* é um helminto hematófago do estômago de ruminantes, de distribuição mundial e altamente prevalente em rebanhos ovinos criados extensivamente também em várias regiões do Brasil (MELO, 2005). Este verme induz a produção de citocinas Th2, como as interleucinas 4, 5 e 13 (GILL *et al*, 2000; ALBA-HURTADO e MUÑOZ-GUZMÁN, 2013), além de uma forte resposta por anticorpos, com degranulação de mastócitos e citotoxicidade por eosinófilos dependentes da IgE, especialmente na mucosa do abomaso, nicho do parasitismo por este verme (MEEUSEN e BALIC, 2001).

Seguindo os trabalhos pioneiros de Tim Mossmann, que propunham a existência perfis celulares e de citocinas Th1 e Th2 para o controle da resposta imune (MOSSMANN *et al*, 1986), pesquisadores liderados por Alan Sher e Edward Pearce mostraram no modelo murino de co-infecção, que o platelminto *Schistosoma mansoni* modulava negativamente a resposta Th1 anti-viral (PEARCE *et al*, 1991; SHER *et al*, 1991; ACTOR *et al*, 1993) ou a resposta contra o toxóide tetânico (SABIN *et al*, 1996). Muitos outros estudos com infecções concomitantes realizados ao longo da década de 1990, especialmente envolvendo helmintos, corroboraram estes achados, culminando com os trabalhos de Maria Yazdanbakhsh, uma das pioneiras na proposição da “Hipótese da Higiene” (YAZDANBAKHSH, 1999;

YAZDANBAKHSI *et al*, 2001, 2002). Outras tantas publicações desde então e até o presente acrescentaram novas contribuições, em diferentes modelos de co-infecções, particularmente entre helmintos e microparasitas, como recentes os experimentos de Osborne e colaboradores (2014), bem como os de Reese e colaboradores (2014), que em trabalhos complementares utilizando o modelo murino helminto-vírus, começam a colocar luzes nos mecanismos entre a hiperativação Th2 e a inibição Th1, identificando moléculas e seus papéis, como a Ym1, um dos produtos da ativação alternativa de macrófagos dependente de STAT-6.

Com base nas altas prevalências e da co-existência entre o helminto *Haemonchus contortus* e a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* nos rebanhos ovinos e caprinos em várias regiões do mundo, incluindo algumas regiões brasileiras, especialmente as criações do semi-árido nordestino (MACIEL, 2006), e levando-se em conta a já mencionada resposta Th2 montada pelo verme e a importância de mecanismos Th1 para a defesa contra esta bactéria, no presente trabalho buscou-se avaliar esta resposta em ovinos co-infectados por estes parasitas, utilizando-se como indicador a produção *in vitro* de interferon- $\gamma$ , a partir de culturas de sangue periférico, usando-se como estímulo dois preparados antigênicos com diferentes graus de pureza.

## **Material e Métodos**

### **Animais**

Os ovinos utilizados nos experimentos foram animais sem raça definida (SRD), com idade entre três meses e seis meses de idade, ambos os sexos, com sorologia negativa para *Corynebacterium pseudotuberculosis* e livres ou infectados naturalmente com *Haemonchus contortus*. Os grupos foram mantidos nas condições de criação intensiva, na unidade experimental do Laboratório de Imunologia, em Salinas da Margarida, Bahia, Brasil.

### **Grupos experimentais**

Os animais foram agrupados e submetidos a dois distintos delineamentos experimentais, conforme a descrição seguinte:

Experimento I, realizado com três grupos. O grupo controle (Ct), foi composto por três animais livres de *Haemonchus contortus* e de *Corynebacterium pseudotuberculosis*; o grupo Cp infectado por *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, por via subcutânea, na região pré-escapular direita, com  $10^7$  CFU, composto por cinco animais; e o grupo de co-infecção (Cp x Hc), com cinco animais previamente infectados com *Haemonchus contortus* e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia zero. Neste experimento o acompanhamento da resposta imune ocorreu nos dias 0, 15, 30, 60, 90, com coletas de sangue para cultura com estímulo com o antígeno Q5 para avaliar a produção *in vitro* de interferon- $\gamma$  e para avaliação da produção de anticorpos IgG específicos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* por ELISA indireto e, coletas de fezes para determinação de OPG e coprocultura.

No experimento II utilizou-se três grupos com cinco animais: grupo Hc, composto por animais infectados com *Haemonchus contortus*, livres de *Corynebacterium pseudotuberculosis*; o grupo CpxHc, com ovinos co-infectados com *Haemonchus contortus* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia zero; e o grupo Cp, com ovinos apenas infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia zero.

A inoculação de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi realizada através da via subcutânea, na região pré-escapular direita, numa dose de  $4,4 \times 10^7$  CFU. A infecção com *Haemonchus contortus* foi realizada por via oral utilizando as larvas infectantes (L3), de acordo com o proposto por Muñoz-Guzmán e colaboradores (2006). E o acompanhamento da resposta imune ocorreu nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 240, com coletas mensais de sangue para: cultura de sangue total com estímulo com o antígeno TPP, para a dosagem *in vitro* de IFN- $\gamma$ , para avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG específicos contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* por ELISA indireto e por *western blot* e, para a coleta de fezes para OPG e coprocultura.

### **Obtenção de bactérias e antígenos**

Em ambos os experimentos utilizou-se linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para as infecções e a linhagem atenuada o preparo dos antígenos, ambas provenientes da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Instituto de

Ciências da Saúde da UFBA. Foram semeadas em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e a seguir cultivadas a 37°C, por 48 horas. Para a inoculação, após centrifugação e lavagem ajustou-se para a quantidade de CFU a ser inoculada; para o teste imunoenzimático ELISA utilizou-se o sobrenadante destas culturas (antígeno BHI) obtido conforme Carminatti et al (2003); para a estimulação das culturas de sangue do primeiro experimento utilizou-se a fração antigênica Q5, obtida segundo Rodrigues (2009); finalmente, para a estimulação das culturas do segundo experimento e para o *western blot* usou-se a fração antigênica TPP (PAULE *et al*, 2004)

#### **Avaliação da produção *in vitro* de interferon- $\gamma$**

Foi realizada a partir do sobrenadante de culturas de sangue total, mantidas por 48 horas, segundo Rebouças e colaboradores (2011). Como já mencionado, para o experimento I utilizou-se como estímulo a fração antigênica Q5 e no experimento II a fração TPP.

#### **Avaliação da produção de anticorpos da classe IgG específicos para *Corynebacterium pseudotuberculosis***

Os níveis séricos de IgG foram determinados pelo ensaio imunoenzimático ELISA e o reconhecimento de frações antigênicas foi realizado através de *western blot*, ambos procedimentos segundo o protocolo de Rebouças e colaboradores (2013).

#### **Contagem de ovos por grama de fezes e cultivo de larvas**

Para a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de nematódeos gastrintestinais, utilizou-se a técnica de Gordon e Whitlock, modificada por este último (WHITLOCK, 1948). A coprocultura e a contagem de larvas foi realizada pela técnica de Ueno e Gonçalves (1994).

#### **Análise estatística**

Como as variáveis estudadas apresentaram distribuição normal, optou-se pela utilização de testes estatísticos paramétricos por dependerem do conhecimento da distribuição da variável na população. As tendências centrais dos grupos independentes, dois a dois, foram

comparadas pelo ANOVA. Todas as análises dos dados obtidos foram feitas com o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 12.0 para Windows.

### Questões éticas

Este trabalho foi aprovado pelo CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA), sob protocolo *n*º 071/2014.

## Resultados

### Experimento I

#### Produção *in Vitro* de interferon- $\gamma$ em cultura de sangue total frente ao estímulo antigênico Q5

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos com a produção *in vitro* de interferon- $\gamma$  em culturas de sangue total de ovelhas, no tempo 0, 15, 30, 60 e 90 dias, nos três grupos experimentais.

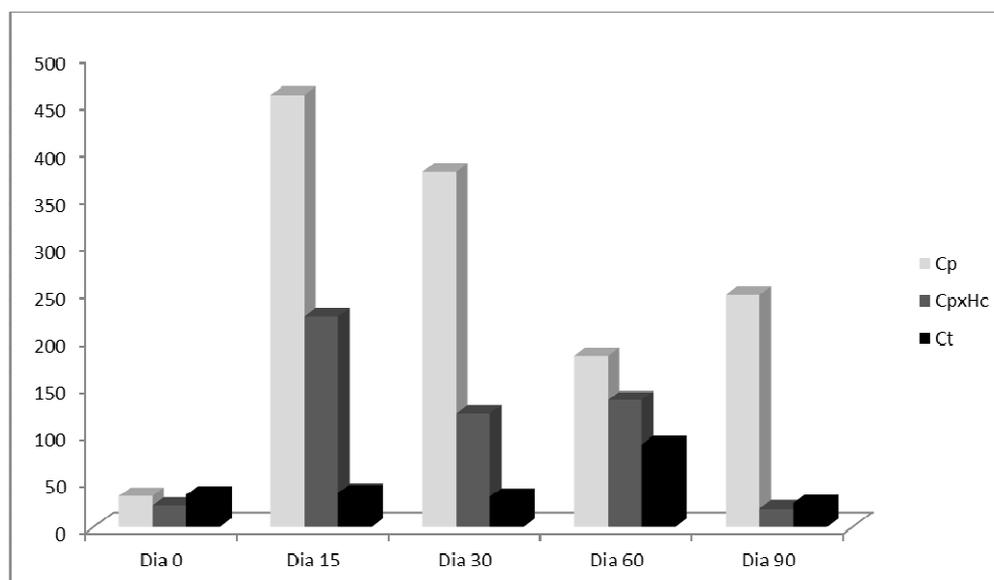


Figura 1 – Produção *in vitro* de interferon-gama (pg/mL) por células do sangue periférico após estímulo com 40ug de da fração Q5 por ovinos dos três grupos experimentais. Grupo Cp (n=5): Animais infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Grupo Cp x Hc (n=5): Animais co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* (naturalmente infectados) e Grupo controle (n=3): Animais inoculados com solução salina 0,9%.

Observa-se que no tempo zero a dosagem foi basal para todos os grupos. O grupo dos animais infectados com *C. pseudotuberculosis* apresentou uma maior expressão desta citocina quando comparado com o grupo de co-infecção em todos os tempos pós-infecção, entretanto sem diferença estatisticamente significativa.

Nos tempos de 30 e 60 dias de infecção o grupo de co-infecção apresentou maior expressão desta citocina quando comparada ao tempo zero ( $p < 0,05$ ). O grupo representado pelos animais co-infectados apresentou uma queda estatisticamente significativa aos 90 dias de infecção quando comparados aos 30 dias de infecção ( $p < 0,05$ ). Redução semelhante observou-se no mesmo grupo no tempo 90 dias quando comparada ao tempo de 60 dias de infecção ( $p < 0,05$ ). Com 30 dias observou-se também diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos experimentais, mantendo o padrão de expressão observado a partir dos 15 dias de infecção, com expressão aumentada de IFN- $\gamma$  no grupo infectado com *C. pseudotuberculosis* ao se comparar com o grupo de co-infecção ( $p < 0,05$ ). Ambos os grupos experimentais apresentaram maior produção da referida citocina em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Utilizou-se o mitógeno pokeweed (PWM) como controle de reatividade das culturas, obtendo-se sempre valores desta citocina acima de 1000 pg/mL.

### Produção de IgG total pelos ovinos ao longo da infecção.

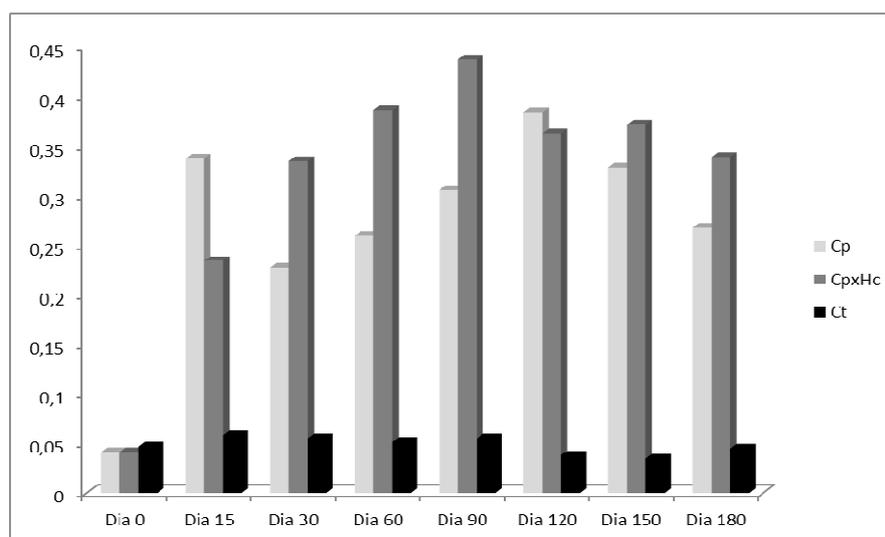


Figura 2 – Cinética da produção de IgG total específica anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos ao longo de 90 dias. Grupo Cp (n=5): Infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Grupo Cp x Hc (n=5): Co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* (infecção natural) e Grupo Ct (n=3): Controle inoculado com solução salina 0,9%. ELISA Indireto sensibilizado com antígeno BHI. Ponto de corte utilizado foi 0,250 D.O.

Ao se analisar a produção de IgG ao longo do tempo, observa-se que não existe diferença estatística entre os grupos no tempo zero e que o grupo controle apresentou níveis basais durante os 180 dias de infecção.

Os dois grupos experimentais apresentaram produção expressiva de IgG *anti-Corynebacterium*, mas sem diferença estatística entre eles em todos os tempos. Nos dias 30, 60, 90, 120, 150 e 180 constatou-se diferenças estatisticamente significantes quando comparados os grupos controle e infectado com *Corynebacterium pseudotuberculosis* ( $p < 0,01$ ). Ao comparar o grupo de co-infecção com o grupo controle houve diferença aos 60 ( $p < 0,01$ ), 90, 120 e 150 ( $p < 0,05$ ) dias de infecção.

No tempo de 60 dias observou-se diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos ( $p < 0,01$ ).

Foi observado na análise entre os tempos, diferença estatisticamente significativa no grupo Cp, em todos os pontos pós-inoculação em relação ao tempo zero, sendo 15, 30, 150 e 180 dias ( $p < 0,05$ ) e 360, 90 e 120 dias ( $p < 0,01$ ). No grupo de co-infecção essa diferença só ocorreu entre o dia zero e o dia 60 ( $p < 0,05$ ).

### Acompanhamento da infecção pelo *Haemonchus contortus*

A Figura 3 apresenta os resultados da contagem de ovos liberados nas fezes dos animais dos grupos Controle e Co-infecção. Levando-se em conta o ponto de corte de 700 ovos por grama de fezes, o grupo co-infecção já apresentou valores superiores (medianas) a este limite no dia 15.

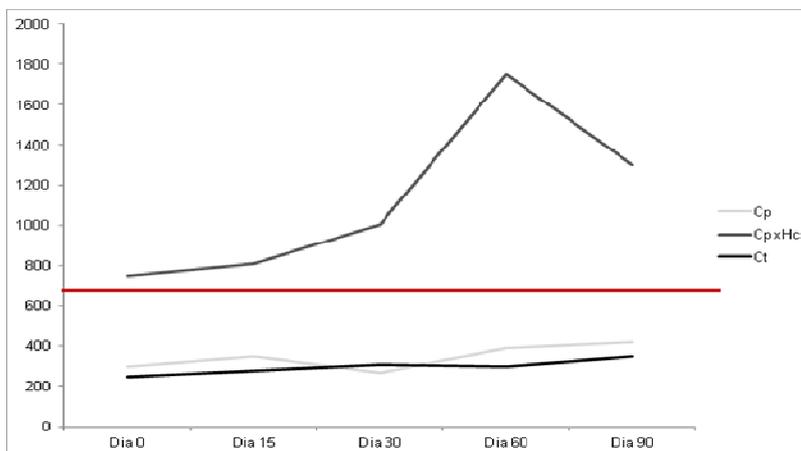


Figura 3 – Medianas dos valores de OPG nos animais dos grupos Cp, CpxHc e Ct, ao longo de 90 dias de infecção (ponto de corte = 700).

## Experimento II

### Produção *in vitro* de interferon- $\gamma$ em cultura de sangue total frente ao estímulo antigênico TPP

Conforme pode ser constatado na figura 4, no tempo zero todos os grupos apresentaram níveis baixos, como era esperado. A partir do dia 15 os grupos Cp e CpxHc apresentaram grande aumento na expressão de interferon- $\gamma$  quando comparados ao tempo zero ( $p < 0,01$ ).

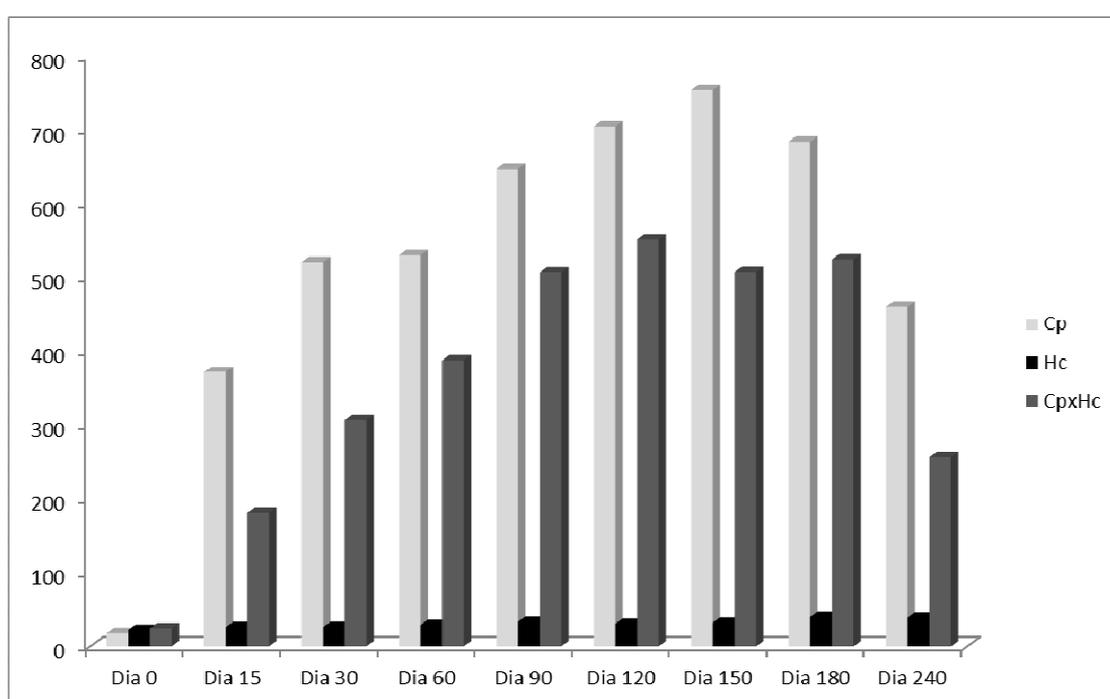


Figura 4 – Produção *in vitro* de interferon-gama por células do sangue periférico após estímulo com 40 $\mu$ g de da fração TPP. Grupo Cp (n=5): Animais infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Grupo Cp x Hc (n=5): Animais co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus* e Grupo Hc (n=5): Animais infectados com *Haemonchus*

Os valores de interferon- $\gamma$  contabilizados para os animais do grupo infectado com *Corynebacterium pseudotuberculosis* nos tempos de 60, 90, 120, 150 e 180 dias foram superiores àqueles verificados aos 15 dias ( $p < 0,01$ ). A partir do dia 180 esta produção declina. Enquanto crescente, apresentou diferenças estatísticas quando comparou-se 90 ( $p < 0,05$ ), 120, 150 e 180 dias ( $p < 0,01$ ) com 60 dias pós-inóculo.

Aos 90 dias de infecção, a produção desta citocina foi significativamente mais elevada que 15, 30 ( $p<0,01$ ) e 60 dias ( $p<0,05$ ). O pico observado aos 150 dias foi superior a produção correspondente a 90 dias de infecção ( $p<0,05$ ) e o oposto foi visto com a diminuição significativa aos 240 dias quando comparado ao tempo de 90 dias ( $p<0,01$ ).

A produção da citocina em estudo nos tempos de 120, 150 e 180 dias foi superior aos tempos anteriores de 15, 30, 60 dias, bem como ao último tempo experimental ( $p<0,01$ ).

Em todos os pontos experimentais pós-infecção, os animais infectados com *C. pseudotuberculosis* apresentaram maior expressão desta citocina em relação aos animais co-infectados ( $p<0,01$ ), 90 dias ( $p<0,05$ ).

O grupo Hc, livre de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, se manteve em níveis basais ao longo de todo experimento.

Os valores referentes aos controles negativos, que não receberam estímulo e aos controles positivos, estimulados com o mitógeno PWM funcionaram a contento, garantindo a qualidade das culturas de sangue periférico. No entanto não foram incluídos nos gráficos, pois títulos discrepantes comprometeriam a interpretação clara dos dados.

### Produção de IgG total ao longo da infecção.

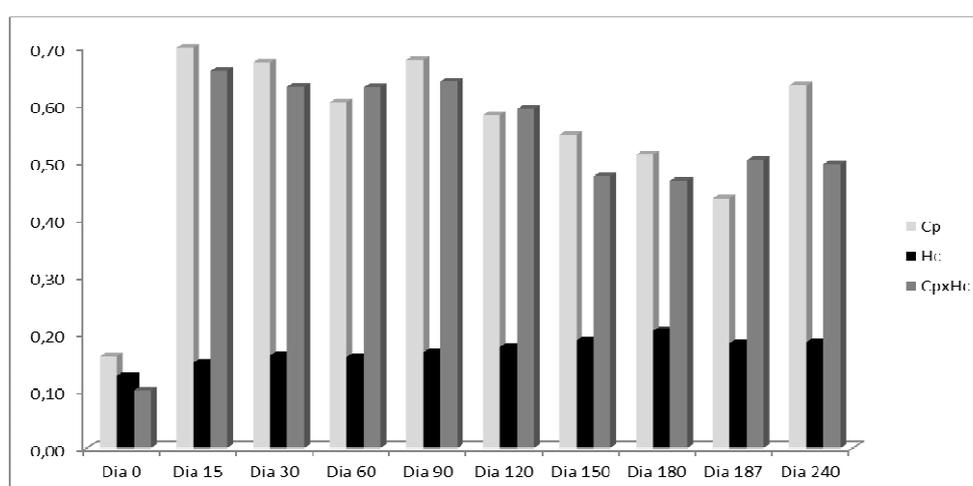


Figura 5 – Cinética da produção de IgG total específica anti-*C. pseudotuberculosis* em ovinos ao longo de 240 dias de observação. Grupo Cp (n=5): Infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Grupo Hc (n=5): Infectados com *Haemonchus contortus*; Grupo Cp x Hc (n=5): Co-infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus*. ELISA Indireto usando antígeno BHI. Ponto de corte utilizado foi 0.250 D.O.

Os valores de densidade ópticas no dia zero se apresentaram baixos no tempo zero, aumentando expressivamente aos 15 dias de infecção para os grupos infectados com *C. pseudotuberculosis* e co-infectados, até o fim do experimento.

Os grupos Cp e CpxHc apresentaram produção de IgG muito similares em todos os tempos experimentais. Mas, ambos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativa quando comparados com o grupo Hc, em todos os tempos pós-inoculação.

Na comparação entre os tempos, só houve diferença no grupo infectado com *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cp) aos 15, 30 e 90 dias em relação ao tempo zero.

### Reconhecimento antigênico através de western blot

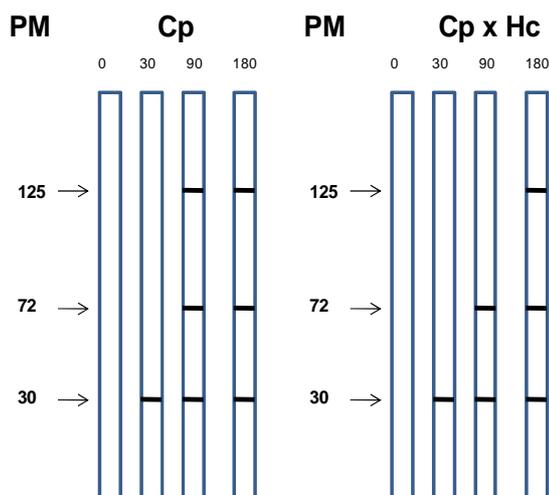


Figura 6 – Representação esquemática dos resultados do *western blot* realizado com *pool* de soros dos animais dos grupos Cp e Cp x Hc, nos dias 0, 30, 90 e 180.

A figura 6 ilustra os achados quanto ao reconhecimento de frações antigênicas a partir de pool dos soros de cada um dos grupos (Cp e CpxHc), obtidos nos dias 0, 30, 90 e 180 por representarem, através do teste ELISA, momentos ainda sem resposta (dia 0) com resposta alta (dias 30 e 90) e em declínio. Apesar de numerosas bandas terem sido fracamente reveladas, foi possível observar-se o reconhecimento de uma banda com peso molecular em torno de 30 kDa

no trigésimo dia, e duas outras bandas de cerca de 72 e 120 kDa no dias 90 e 180. Com exceção da ausência de imunorreatividade para a banda de 120 kDa aos 180 dias, não foram observadas outras diferenças entre os dois grupos.

## **Discussão**

A importância do IFN $\gamma$  na resposta imune celular contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* já foi anteriormente descrita (LAN *et al.*, 1998 e PÉPIN *et al.*, 1998). Em um estudo utilizando a dosagem de IFN $\gamma$  como um possível marcador para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos e ovinos, observou-se também associação entre altos níveis desta citocina em animais com granulomas (REBOUÇAS *et al.*, 2011). Dentre as principais ações do IFN $\gamma$  destaca-se a ativação de macrófagos e a indução da expressão de moléculas apresentadoras de antígenos - MHC de classe I e II, sendo a sua produção estimulada principalmente pela IL-12. Esta citocina tem papel decisivo no controle de infecções por microrganismos intracelulares (PERRY *et al.*, 1997; SCHOENBORN, *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2012). Assim, embora não se tenha dúvida de que a resposta por anticorpos seja de grande importância para a neutralização do principal fator de virulência desta bactéria, a sua fosfolipase D (DORELLA *et al.*, 2006), mecanismos que venham a reduzir ou inibir a resposta imune Th1 contra este microrganismo, certamente permitirão a evolução desfavorável desta doença para o hospedeiro.

### **Avaliação da reatividade *in vitro* de células do sangue periférico**

Paule e colaboradores (2003), mostraram a produção de IFN $\gamma$  em caprinos utilizando antígenos secretados. Logan e colaboradores (2005) demonstraram em bovinos infectados com *M. bovis*, que altas concentrações de IFN $\gamma$  indicam momentos ou períodos de proliferação do microrganismo.

Resultados preliminares mostraram que células dos camundongos infectados com a linhagem selvagem VD57, sob a ação dos estímulos antigênicos em estudo, apresentaram um

pico com 15 dias de infecção para as citocinas TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-4, decrescendo aos 35 dias. Nos animais deste grupo, os antígenos secretados, total e fracionado, apresentaram resultados muito semelhantes quanto ao padrão e quantidade de citocinas produzidas “*in vitro*”, havendo diferenças estatisticamente significantes somente nos níveis de TNF $\alpha$  e IL-4 produzidos, sendo que a fração Q5 induziu maior produção de ambas as citocinas. Este grupo experimental desenvolveu a doença, com formação de granulomas, perda de peso e alto índice de mortalidade. Esta forte resposta inflamatória inicial observada nesses camundongos foi evidenciada pela elevada produção de TNF $\alpha$ , sob a ação dos dois estímulos (RODRIGUES, 2009).

No presente trabalho, o antígeno Q5 induziu maior expressão de IFN $\gamma$  nos animais inoculados apenas com *Corynebacterium pseudotuberculosis* quando comparado aos animais co-infectados em todos os tempos pós-infecção sugerindo uma modulação da resposta imune pelo *H. contortus*. Apesar desta diferença estar nitidamente evidente (figura 1), diferença estatisticamente significativa só foi observada aos 30 dias de infecção, provavelmente devido ao desvio padrão nestes grupos, nos demais tempos experimentais.

Esta variabilidade de resposta por IFN $\gamma$  é observada nos animais experimentais em cada ponto de coleta e ao longo do período experimental. Conforme os trabalhos de Prescott e colaboradores (2002), bem como de Sunil e colaboradores (2008), quanto aos valores de IFN $\gamma$  produzido *in vitro* por células sanguíneas, alguns animais elevam seus valores enquanto que outros decrescem os valores em um mesmo ponto de coleta; em nossos experimentos, além de ocorrerem discrepâncias entre os valores de diferentes animais inoculados num mesmo dia e com a mesma dose bacteriana, as flutuações ocorreram também ao longo da própria cinética de resposta de cada indivíduo. Segundo estes autores, estas flutuações ocorreriam devido a fatores como a fase da doença, severidade da infecção, grau de disseminação bacteriana no organismo, ao status de saúde do animal, bem como a heterogeneidade genética. Em nossos experimentos utilizou-se animais sem raça definida, com diferentes padrões fenotípicos (embora com predomínio de fenótipo Santa Inês, considerada raça resistente a este helminto), certamente incluindo animais com maior ou menor resistência ao *Haemonchus contortus*, o que deve ter se constituído num fator de variabilidade de resposta por esta citocina. Estas

variações também são observadas quando se acompanha a cinética dos níveis plasmáticos desta citocina (SACCHINI *et al.*, 2012).

Ao analisar a produção da citocina estudada diante do estímulo do antígeno TPP, a modulação imune foi evidenciada em todos os tempos pós-inoculação, com diferenças estatísticas robustas, no grupo de co-infecção.

O antígeno TPP revelou altos níveis de interferon-gama, especialmente no grupo Cp, confirmando os achados de Rebouças e colaboradores (2011) que verificaram altos índices de produção de IFN- $\gamma$  pela indução do antígeno secretado TPP, bem como os resultados de Meyer e colaboradores (2005), que constataram alta produção desta citocina através do estímulo com antígenos secretados e baixa produção quando os leucócitos foram estimulados com antígeno somático.

A produção de interferon-gama foi evidenciada precocemente, aos 15 dias após infecção. Trabalhos anteriores indicam que níveis significativamente elevados desta citocina já podem ser detectados a partir de 35 dias após a infecção (PRESCOTT *et al.*, 2002; SUNIL *et al.*, 2008). Contudo, estes trabalhos, ambos do mesmo grupo de pesquisa canadense, utilizaram a dose de  $4 \times 10^7$  células de *C. pseudotuberculosis* para a infecção experimental, além de utilizarem estímulos antigênicos baseados em lisados bacterianos (50  $\mu$ g) e células bacterianas inativadas ( $1,5 \times 10^7$  células) para induzir a resposta celular *in vitro*. Possivelmente, as diferenças de resultados podem estar associadas às diferenças de protocolos experimentais.

Os níveis elevados de IFN- $\gamma$  sob estímulo de TPP se mantiveram crescentes até os 180 de infecção, e após este tempo mesmo com decréscimo, apresentou produção expressiva. Já a fração Q5, apresentou produção mais discreta e com queda mais precoce, ainda que o acompanhamento tenha ocorrido apenas até os 90 dias. Considerando que a estimulação com os antígenos secretados foram realizados em experimentos distintos, sendo indivíduos e doses de infecção diferentes, não foi possível comparar o efeito indutor da resposta celular através de ferramentas da estatística.

Considerando que animais geneticamente resistentes à infecção por este helminto apresentam uma resposta imune do tipo Th2 intensa, podendo atuar sinergicamente com os anticorpos, assim contribuindo para expressão da imunidade adquirida no hospedeiro (GILL *et al.*, 2000; PEÑA *et al.*, 2006), os achados no presente trabalho, apesar da já mencionada

limitação pelo tamanho da amostra e da variabilidade genética dos animais estudados, sugerem que esta resposta imune predominantemente Th2 esteja envolvida na modulação negativa na produção de IFN $\gamma$ . Adicionalmente a esta imunidade humoral intensa, caracterizada pela formação de anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE, sendo essa última de grande importância na defesa anti-helmíntica, observa-se também mecanismos de imunidade celular que certamente também contribuem na resistência contra este helminto (WATSON, 1986; MILLER, 1996). Embora a resposta anti-helmíntica não tenha sido avaliada neste trabalho, fica claro que tal resposta pode ser montada, tendo em vista os mensuráveis níveis de IFN $\gamma$  observados nos grupos de co-infecção.

Baseado em todas as evidências revisadas neste estudo, pode-se entender que o efeito imunomodulador induzido pela presença do parasita, pode ser uma das explicações para o aumento da mortalidade nos pequenos ruminantes co-infectados, considerando que além da alteração do perfil imunológico Th1 predominante protetor para o animal, existe a própria debilidade do animal quando acometido por ambas enfermidades.

### **A produção de anticorpos ao longo da imunização**

A imunidade humoral também é importante no combate a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, pois possivelmente dentre outras moléculas, a sua exotoxina, que pode ser neutralizada por anticorpos, é decisiva para a sua disseminação no hospedeiro (BATEY, 1986). Entretanto, é importante destacar que embora a produção de anticorpos seja decisiva para evitar a disseminação da bactéria no organismo hospedeiro, a presença, sobretudo no microambiente do granuloma, de citocinas como IFN- $\gamma$  pode limitar a doença e reduzir a disseminação deste microrganismo (PÉPIN *et al.*, 1997). Por outro lado, de acordo com este autor, a fosfolipase D certamente não participa dos eventos iniciais que levam à formação do granuloma, mas parece ser importante dentro dele, para a persistência crônica destas lesões.

O acompanhamento da cinética da produção de IgG anti-*Corynebacterium pseudotuberculosis* observada no experimento I mostrou que os níveis expressivos deste anticorpo nos grupos Cp e de co-infecção em relação ao tempo zero. A heterogeneidade genética entre indivíduos do mesmo grupo, já discutida anteriormente, certamente explica que

o grupo composto por animais co-infectados só tenha apresentado diferença estatisticamente significativa no tempo de 60 dias, quando comparado ao tempo zero ( $p < 0,01$ ).

No entanto, o grupo Cp x Hc apesar de apresentar maiores valores de densidade ótica quando comparados ao grupo Cp, não mostrou diferença estatística nesta análise. Nos dias 60, 90, 120, 150 e 180 a produção deste anticorpo específico foi significativamente maior para os dois grupos inoculados, quando comparados ao grupo controle. De maneira semelhante a cinética de IgG ocorreu no experimento II, com um pico na produção aos 15 dias pós infecção, decrescendo discretamente aos 120 dias. Ainda assim, a expressão desta imunoglobulina se manteve elevada ao longo de todo o acompanhamento. Em todos os pontos analisados houve diferença entre os grupos de Cp e CpxHc em relação ao grupo Hc. No entanto entre os dois grupos infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*, não se observou diferenças mensuráveis entre eles, resultados estes semelhantes aos encontrados no primeiro experimento.

Os valores elevados para as densidades óticas de IgG, constatados no segundo experimento, estão de acordo com os achados encontrados por Cerqueira (2006), que estudando a resposta humoral em caprinos infectados com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* através de diferentes testes ELISA indiretos, observou que a infecção com linhagem atenuada ou selvagem induzia resposta humoral elevada quando comparadas pelo ELISA utilizando o antígeno TPP obtido de uma linhagem atenuada. Em contrapartida, quando os mencionados resultados obtidos no segundo experimento foram comparados com a fração Q5, observou-se o desenvolvimento de um perfil de resposta bem superior, talvez por se tratar de um antígeno mais puro quando comparado com o TPP que é um secretado total. Apesar do ELISA com antígeno purificado diferenciar os animais infectados com as diferentes linhagens bacterianas (CERQUEIRA, 2006), o teste ELISA com antígeno BHI também apresentou expressiva capacidade de discriminar os grupos compostos por animais infectados, corroborando com os resultados obtidos por Carminati (2005). As diferenças de resultados verificadas entre esses autores se devem, provavelmente, às diferentes concentrações e linhagens bacterianas utilizadas na infecção.

Tais resultados são coerentes com a relação estabelecida entre *Corynebacterium 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, ).

## Conclusões

*Corynebacterium pseudotuberculosis* induz no hospedeiro ovino expressivas respostas imunes dos perfis Th1 e Th2 que podem ser detectadas utilizando-se antígenos secretados por estes microrganismos e preparados com diferentes graus de pureza (BHI, Q5 e TPP). Os antígenos Q5 e TPP se mostraram eficientes em detectar a produção *in vitro* da citocina interferon- $\gamma$  e os níveis de síntese desta citocina foram utilizados como indicadores dos mecanismos mediados por células (Th1). A comparação da referida produção *in vitro* desta citocina entre animais infectados apenas com *Corynebacterium pseudotuberculosis* com aqueles co-infectados com este microrganismo e o com o helminto *Haemonchus contortus*, evidenciou valores mais baixos nestes últimos animais, sugerindo regulação negativa exercida pelo verme, o que é concordante com aqueles de diversas outras publicações que atribuem à hiperestimulação do perfil Th2 por este parasita a responsabilidade sobre este fenômeno. Este fenômeno pode explicar altas prevalências da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em regiões onde a infecção por este microrganismo ocorre concomitantemente com a infecção por este nematódeo. A resposta através de anticorpos avaliada pelo teste imunoenzimático ELISA se mostrou discretamente mais intensa nos animais infectados apenas com a bactéria, embora este aumento não tenha tido significado estatístico.

## Referências bibliográficas

ACTOR, J.; SHIRAIT, M; KULLBERGT, M.; MARK, R.; BULLERT, L; SHER, A.; BERZOFSKYT, J. Immunology Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:948-952, 1993.

ALBA-HURTADO, F.; MUÑOZ-GUZMÁN, M. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. **BioMed Research International** 2013:1-10, 2013.

BASTOS, B.L., MEYER, R., GUIMARÃES, J.E., AYRES, M.C., GUEDES, M.T., MOURA-COSTA, L.F., BURGHGRAVE, U.S., SENA, L., AZEVEDO, V.; BROWN, C.C.; OLANDER, H.J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. **Vet. Bulletin.**, v.57, n.1, p.1-5,1987.

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

BRANDÃO, A.P.; OLIVEIRA, F.S.; CARVALHO, N.B.; VIEIRA, .L.; AZEVEDO, V. MACEDO, G.C.; OLIVEIRA, S.C. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN- $\gamma$  knockout than IL-12/ $\beta$ 2-microglobulin double-deficient mice. **Clin Dev Immunol.** 2012:1-7, 2012.

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

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

DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., OLIVEIRA, S.C., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, 37: 201-218, 2006.

FRAGA, R. Avaliação de aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com linhagem selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Brasil**, 2012.

GILL, H.; ALTMANN, K.; CROSS, M.; HUSBAND, A. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Immunology**, 99(3):458-463, 2000.

GUIMARÃES, A. S.; CARMO, F. B.; HEINEMANN, M. B.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; LAGE, A. P.; SEYFFERT, N.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. . High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. **BMC Veterinary Research**, 7:68, 2011.

HOGARTH, P.; LOGAN, K.; VORDERMEIER, H.M.; SINGH, M.; HEWINSON, R.G.; CHAMBERS, M.A. Protective immunity against *Mycobacterium bovis* induced by vaccination with Rv3109c--a member of the esat-6 gene family. **Vaccine**, 23(20):2557-64, 2005.

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

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

LOGAN, K.E.; CHAMBERS, M.A.; HEWINSON, R.G.; HOGARTH, P.J. Frequency of IFN- $\gamma$  producing cells correlates with adjuvant enhancement of bacille Calmette-Guèrin induced protection against *Mycobacterium bovis*. **Vaccine**, 23(48-49):5526-32, 2005.

MA, F.; XU, S.; LIU, X.; ZHANG, Q.; XU, X.; LIU, M.; HUA, M.; LI, N; YAO, H.; CAO, X. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-g. **Nature Immunology**, 12:861–869, 2011.

MACIEL, F. Manejo sanitário de caprinos e ovinos, **Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte**, Brasil, p. 19-22, 2006.

MELO, A. Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no Estado do Ceará, Brasil. **Tese de Doutorado, Universidade Federal da Ceará**, 2005.

MEEUSEN, E.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? **Parasitology Today**, 16(3):95–101, 2000.

MEYER, R. *Corynebacterium tuberculosis* e seu hospedeiro: aspectos da imunidade, do imunodiagnóstico e da prevalência. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Brasil**, 2003.

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**, 107(3-4):249-254, 2005.

MOSMANN, T.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.; GIEDLIN, M.; COFFMAN, R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol.** 136:2348–2357, 1986.

MUÑOZ-GUZMÁN, M.A.; CUÉLLAR-ORDAZ, J.A.; VALDIVIA-ANDA, G.; BUENDÍA-JIMÉNEZ, J.A.; ALBA-HURTADO, F. Correlation of parasitological and immunological parameters in sheep with high and low resistance to haemonchosis. **Canadian Journal of Animal Science**, v.86, p.363-371, 2006.

OSBORNE, L.; MONTICELLI, L.; NICE, T.; SUTHERLAND, T.; SIRACUSA, M.; HEPWORTH, M.; TOMOV, V.; KOBULEY, D.; TRAN, S.; BITTINGER, K.; BAILEY, A.; LAUGHLIN, A.; BOUCHER, J.; WHERRY, E.; BUSHMAN, F.; ALLEN, J.; VIRGIN, H.; ARTIS, D. Virus-helminth coinfection reveals a microbiota-independent mechanism of immunomodulation. **Science**, 345(6196):578-82, 2014.

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

PAULE, B.J.A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L.F.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.C.; VALE, V.L.C.; MOURA-COSTA, L.F.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon production, IgG avidity and antigen recognition by Western Blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 96:129-139, 2003.

PAULE, B.J.A., MEYER, R., MOURA-COSTA, L.F., BAHIA, R.C., CARMINATI, R., REGIS, L.F., VALE, V.L.C., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of

immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Protein Expression and Purification**, v. 34, p. 311-316, 2004.

PEARCE, E; CASPAR, P.; GRZYCH, J; LEWIS, F.; SHER, A. Downregulation of Th1 Cytokine Production Accompanies Induction of Th2 Responses by a Parasitic Helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, 173:159-166, 1991.

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

PERRY, L.L.; FEILZER, K.; CALDWELL, H.D. Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma-dependent and -independent pathways. **J. Immunol.** vol. 158(7):3344-3352, 1997.

PRESCOTT, J.F., MENZIES, P.I., HWANG, Y.T. An interferon-gama assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Veterinary Microbiology**, **88**:287–297, 2002.

PORTELA, R.W. Haptoglobin and fibrinogen concentrations and leukocyte counts in the clinical investigation of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Clinical Pathology**, 40:1-8, 2011.

REBOUÇAS, M.F., PORTELA, R.W., LIMA, D.D., LOUREIRO, D., BASTOS, B.L., MOURA-COSTA, L.F., VALE, V.L., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific interferon-gama production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 23: 213-220, 2011.

REBOUÇAS, M.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B.; MOURA-COSTA, L.; HANNA, S.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. **Pesq. Vet. Bras.** 33(11):1296-302, 2013

REESE, T.; WAKEMAN, B.; CHOI, H.; HUFFORD, M.; HUANG, S.; ZHANG, X.; BUCK, M.; JEZEWSKI, E.; KAMBAL, K.; LIU, C.; GOEL, G.; MURRAY, P.; XAVIER, R.; KAPLAN, H.; RENNE, R.; SPECK, S.; ARTYOMOV, M.; PEARCE, E.; VIRGIN, H. Helminth infection reactivates latent  $\gamma$ -herpesvirus via cytokine competition at a viral promoter. **Science** 345:573, 2014.

RODRIGUES, G. Papel de antígenos secretados de *corynebacterium pseudotuberculosis* na indução de resposta imune em camundongos. **Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia**, 2009.

SABIN, E.; ARAUJO, M.; CARVALHO, E.; PEARCE, E. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **J Infect Dis**, 173:269–272, 1996.

SACCHINI, F.; LUCIANI, M.; SALINI, R.; SCACCHIA, M.; PINI, A.; LELLI, R.; NAESSENS, J.; POOLE, J.; JORES, J. Plasma levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 during a course of experimental contagious bovine pleuropneumonia **BMC Veterinary Research** 2012, 8:44

SCHOENBORN, J.R.; WILSON, C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Adv Immunol.** 96:41-101, 2007.

SHER, A.; FIORENTINO, D; CASPAR, P.; PEARCE, E.; MOSMANN, T. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J Immunol**, 147:2713-6, 1191.

SOUZA, A. Avaliação *in vitro* de aspectos da resposta imune à *Corynebacterium pseudotuberculosis* atenuada e selvagem. **Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2014.**

SUNIL, V., P.I.MENZIES, P.E. SHEWEN, J.F. PRESCOTT. Performance of a whole blood interferon-gamma assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary Microbiology**, 128(3-4):288-297, 2008.

UENO, H., GONÇALVES, P.C. Coprocultura para identificação de larvas de nematóides gastrointestinais. *In: Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*, 3.ed. Porto Alegre: Cultura Gráfica e Editora, 166p., 1994.

WHITLOCK, H.V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **J. Counc. Sci. Ind. Res.**, 21:177–180, 1948.

YAZDANBAKHS, M. Common features of T cell reactivity in persistent helminth infections: lymphatic filariasis and schistosomiasis. **Immunology Letters**, 65:109–115, 1999.

YAZDANBAKHS, M., BIGGELAAR, A., MAIZELS, R. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. **Trends in Immunology**, 22 (7):41, 2001.

YAZDANBAKHS, M.; KREMSNER, P.; VAN REE, R. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. **Science**, 296:490, 2002.

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

## ARTIGO 2

### **Resposta Imune Contra o *Haemonchus contortus* e o Paradigma Th1-Th2 na Infecção por Helmintos.**

Gabriele Rodrigues<sup>2</sup>, Marcos Silva<sup>2</sup>, Bruno Bastos<sup>3</sup>, José Tadeu Reynal<sup>1</sup> e Roberto Meyer<sup>1</sup>

#### **Resumo**

A resposta imune adaptativa tem como elementos centrais os linfócitos T CD4+ que atuam estimulando ou inibindo mecanismos efetores que especificamente reconhecem e eliminam ou restringem a ação de agentes que agridem seus hospedeiros. A identificação de subpopulações destas células teve início com os trabalhos de Mossmann e colaboradores em 1986, responsáveis pela postulação inicial da existência não só de tais subpopulações, por eles denominadas Th1 e Th2, como também de seus perfis de citocinas. Nas décadas seguintes mais cinco outras subpopulações e perfis foram determinados, mais comumente abreviados como Treg, Th17, Th9, Th22 e Thf. Apesar destas novas descobertas, bem como da complexidade do comportamento multifuncional destas células, o paradigma Th1-Th2 continua válido e neste contexto está claro que as respostas geradas por estas células não só dependem da interação do hospedeiro com cada patógeno, como também das interações simultâneas destes patógenos entre si e com o hospedeiro, quer sejam entre macroparasitas, entre microparasitas ou entre macro e microparasitas. Nas co-infecções entre helmintos e outros parasitas, muitos são os trabalhos presentes na literatura que evidenciam a intensa estimulação Th2 exercida por estes vermes e a conseqüente regulação negativa do perfil Th1.

---

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade do Estado da Bahia

<sup>3</sup> Instituto Multidisciplinar em Saúde da UFBA

Endereço dos autores para correspondência:

Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brazil. CEP: 40.110-100

Phone: 55-71- 3332-3341

Fax: 55-71-3235-9682

e-mail: [rmeyer@ufba.br](mailto:rmeyer@ufba.br); (R. Meyer)

Dentro deste panorama, apresenta-se a seguir o estado da arte acerca de diversos aspectos destas mencionadas interações, inicialmente abordando os principais mecanismos de resposta imune induzidos pelo helminto *Haemonchus contortus*.

**Palavras-chave:** *Haemonchus contortus*, resposta imune Th1 – Th2, co-infecção, regulação negativa.

## 1 Introdução

Quando descreveram duas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, denominando-as de Th1 e Th2, Mossmann e colaboradores (1986) postularam que cada uma delas produzia citocinas, em geral com ações antagônicas, sendo responsáveis, de modo bem definido pela ativação dos mecanismos de resposta imune celular, dependente principalmente da citocina IFN $\gamma$  (Th1) e humoral, dependente principalmente da citocina IL-4 (Th2). Assim, passou-se a acreditar que nestes dois padrões de função dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> residia, uma vez que adequadamente estimulados, a capacidade plena de resposta imune e de resolução de infecções por patógenos intracelulares (Th1) ou a helmintos e microrganismos de exposição extracelular (Th2). Entretanto, o avanço do conhecimento nas últimas três décadas evidenciou a grande diversidade de citocinas e a maleabilidade funcional de suas células produtoras, melhor definindo os seus fenótipos e esclarecendo os seus papéis em diferentes situações e microambientes do organismo. Desta forma, novas subpopulações passaram a ser consideradas, desde aquela com clara função regulatória, de fenótipo CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>foxp3, mais conhecida como Treg (SAKAGUCHI *et al*, 2003); as subpopulações Th17 (HARRINGTON *et al*, 2005) e Th22 (EYERICH *et al*, 2009), a primeira relacionada com a indução de inflamação e a segunda com o reparo tecidual, ambas também com papéis na defesa antimicrobiana; as células Th9, com papel antitumoral e na defesa antihelmíntica (VELDHOEN, 2008), bem como as células T dos folículos linfóides – Tfh (CROTTY, 2011), principalmente ligadas à maturação da resposta por linfócitos B.

Apesar da referida maleabilidade e consequente multifuncionalidade de cada uma destas subpopulações (PEREZ-MAZLIAH & LANGORNE, 2014), a idéia geral de uma

estimulação que majoritariamente induza por um lado mecanismos mediados por células e por outro àqueles mediados por anticorpos, particularmente da classe IgE, ou seja, o paradigma Th1-Th2, continua sendo aceita. Neste contexto, há muito se evidencia a forte indução de uma ou de outra destas subpopulações em diferentes infecções parasitárias. Um dos melhores exemplos é a resposta imune contra helmintos, onde o predomínio do padrão de reatividade Th2 tem sido repetidamente comprovado desde os trabalhos iniciais de Mosmann. Nesta revisão, além da abordagem sobre a imunidade na hemonose como um modelo de resposta imune anti-helmíntica, discute-se também as principais ocorrências/conseqüências da co-infecção envolvendo helmintos e outros parasitas, sobre o sistema imune do hospedeiro.

## **2 Metodologia**

A busca eletrônica foi conduzida nas bases de dados Medline/Pubmed, Lilacs e Science Direct. Foram utilizados os seguintes descritores na língua portuguesa e os seus correspondentes no idioma inglês: co-infecção, subpopulações de linfócitos T, linfócitos Th1, Th2, regulação negativa Th1, helmintos, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemonchus contortus*. Não houve delimitação de período.

## **3 Estado da Arte**

### **3.1 A resposta Imune contra *Haemonchus contortus***

O gênero *Haemonchus*, de possível origem africana, possui várias espécies importantes e dentre elas se destaca *Haemonchus contortus* (HOBBERG *et al*, 2004). Trata-se de um nematódeo hematófago da ordem *Strongylida* e da família *Trichostrongylidae*, se constituindo num dos mais patogênicos helmintos de ruminantes. Tem o estômago destes animais como órgão alvo para sua atividade parasitária, onde se prende na mucosa do abomaso, aí se alimentando do sangue hospedeiro. Neste local ocorre o acasalamento, aonde as fêmeas chegam a liberar cerca de 10.000 ovos por dia. O seu ciclo biológico inclui cinco estágios

larvares que se inicia nas fezes. A forma infectante é a larva L3 que no ambiente gástrico perde o seu envoltório cuticular, se transforma na forma L4, esta última se transformando na forma adulta (MELO, 2005).

Mecanismos inatos e adaptativos de resposta imune são descritos contra este parasita, tanto contra seus antígenos somáticos, como contra seus antígenos excretados/secretados. Ambos os mecanismos são essenciais para a eliminação deste patógeno, os primeiros estão associados a uma rápida eliminação, particularmente em animais naturalmente resistentes, enquanto que os segundos exigem um contato prévio (MEEUSEN *et al*, 2005). Uma importante dificuldade para a eficácia da resposta adaptativa reside nos diferentes antígenos apresentados por este verme ao longo do seu ciclo biológico, onde cada estágio larvar tem seus antígenos específicos (BOWLES *et al*, 1995). Muitos animais são naturalmente resistentes a este helminto, embora os mecanismos que geram tal resistência ainda não estejam muito claros. Certamente trata-se de característica individual relacionada com a idade, raça e condição de infecção ou de reinfecção (ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2013). Como na infecção por outros helmintos, o controle pelo hospedeiro da infecção pelo *Haemonchus contortus* depende principalmente da resposta Th2 (SHAKYA *et al*, 2009).

### **3.1.1 Mecanismos de Imunidade Inata**

Nos seus hospedeiros, as principais barreiras físicas e químicas contra a infecção por este helminto são, respectivamente, os movimentos peristálticos e o muco que recobre a superfície interna do órgão alvo (MILLER, 1996). Em algumas raças mais resistentes a este parasita, a ação da grelina, hormônio com ação sobre a contratilidade e secreção gástrica, parece ter participação na sua eliminação (INGHAM *et al*, 2011). Uma vez fixado na mucosa do abomaso, a ativação do sistema complemento, através da via alternativa, se constitui num dos mecanismos iniciais de resposta inata contra este verme (MEEUSEN & BALIC, 2011), resultando na geração das anafilatoxinas C3a e C5a que mobilizam eosinófilos para o local, induzindo também a sua degranulação (REINHARDT & SIMPSON, 2011), o que resulta na liberação da proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN), peroxidase eosinofílica (EOP), todos com ação tóxica sobre helmintos, além de e derivados lipídicos como fator de agregação plaquetária, lipoxinas, leucotrienos, prostaglandina E2, com ações inflamatórias (BEHM & OVINGTON,

2000). Outro estímulo para a atração destas células, bem como para mastócitos e neutrófilos, decorre da ação de moléculas secretadas pelo referido helminto (BALIC *et al*, 2002). A eosinofilia na mucosa do abomaso decorrente de infecção por outros helmintos, como *Oestrus ovis* ou *Taenia hydatigena*, leva à resistência numa subsequente infecção pelo *Haemonchus* (DORCHIES *et al*, 1997; CUENCA-VERDE *et al*, 2011).

O papel do mastócito na resposta inicial contra *Haemonchus contortus* tem sido bastante estudado, quer no aumento de infiltrados destas células (e de basófilos) na mucosa, quer na sua presença no interior de células epiteliais do revestimento mucoso (“globule leucocytes”). Estas células liberam, como é bem conhecido, vários mediadores da inflamação. Particularmente para a rápida eliminação deste parasita é de fundamental importância o papel da histamina, através da sua ação estimulatória da hipersecreção de muco e do aumento da motilidade do abomaso (HOHENHAUS & OUTERIDGE, 1995).

Embora muitos autores destaquem o papel de linfócitos  $T\gamma\delta$  no combate à infecção por *Haemonchus contortus*, e realmente se observa o aumento da população destes linfócitos nos infiltrados celulares da mucosa do abomaso nas infecções por este verme, entretanto, não tem sido claramente comprovada a relação entre este aumento e a efetiva defesa contra este parasita (BALIC *et al*, 2002). Segundo Gonzalez e colaboradores (2011), a intensa presença destas células, geralmente associada a uma eosinofilia, estaria relacionado com a redução da fecundidade destes helmintos.

### 3.1.2 A Resposta por Anticorpos

Anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE tem sido detectados nos soros, fezes e secreções mucosas de ruminantes infectados pelo *Haemonchus contortus* (SMITH & CHRISTIE, 1978, GILL, 1993; ALBA-HURTADO & MUÑOZ-GUZMÁN, 2013). Estudando a presença de células produtoras de anticorpos contra este parasita na mucosa do abomaso, Gill e colaboradores (1992) detectaram e quantificaram plasmócitos IgA+, em animais sensíveis e resistentes, constatando níveis equivalentes neste dois grupos, levando-os a concluir que o aumento destas células não se correlacionava com resistência ao patógeno. Entretanto, avaliando a correlação entre resistência à hemoncose e níveis de anticorpos séricos e fecais contra este parasita, também Gill e colaboradores, 1993, observaram que anticorpos da

classe IgA e IgG1 em ovinos correlacionam positivamente com resistência e negativamente com a quantidade de ovos do parasita eliminada em cada grama de fezes (OPG). Estudando a distribuição e quantidade de plasmócitos IgA<sup>+</sup> na mucosa do abomaso de animais resistentes e sensíveis ao *Haemonchus contortus*, Munhoz-Guzmán e colaboradores, 2012, demonstraram existir um mesmo padrão em ambos os casos, enquanto outros autores, em experimentos semelhantes, encontraram expressivos aumentos destas células carregando IgG em suas membranas (PEREZ *et al*, 2001).

A resposta por anticorpos da classe IgE é a mais típica expressão da estimulação Th2 (MCSORLEY & MAIZELS, 2012) e diversos autores tem demonstrado a importância destas moléculas na resposta adaptativa contra *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. Avaliando a resposta de ovinos sem raça definida contra este helminto, de la Chevrotière e colaboradores, 2012 evidenciaram que a resposta por anticorpos IgA não se correlacionava com os indicadores de proteção e o inverso ocorria com a resposta por anticorpos IgE. Avaliando a resposta de ovinos jovens, Schallig (2000) constatou que a incapacidade de montar uma resposta Th2 específica contra estes vermes, particularmente com uma expressiva síntese de anticorpos IgE, tornava estes animais vulneráveis a infecção com este helminto. Avaliando a resposta imune a antígenos secretados por este parasita, Kooyman e colaboradores (2000) concluíram que animais de três, seis e nove meses de idade apresentam uma capacidade crescente de gerar resposta Th2 protetora, com uma também crescente capacidade de produzir anticorpos IgE específicos contra tais antígenos. Estudando a resposta por anticorpos desta classe, Van Die e colaboradores (1999) identificaram um domínio  $\alpha 1 \rightarrow 3$ -fucose, presente na superfície de *Haemonchus contortus*, reconhecido por estes anticorpos – este epitopo é encontrado na superfície de outros helmintos, em outros grupos animais e em plantas e está associado à indução de reações de hipersensibilidade do tipo I. Buscando melhor entender as ações de anticorpos IgE em pequenos ruminantes, estudos também tem sido conduzidos para a caracterização de receptores para este anticorpo em mastócitos e eosinófilos destes animais (MCALEESE *et al*, 2003; HINE *et al*, 2010).

Vários protocolos de imunização contra *Haemonchus contortus* tem sido conduzidos em ovinos, utilizando antígenos de superfície externa, de superfície intestinal, bem como aqueles secretados. A maioria destes experimentos visa estimular a produção de anticorpos que possam desencadear mecanismos como a degranulação de mastócitos ou citotoxicidade por

eosinófilos – 95 artigos descrevendo estes protocolos e seus resultados estão registrados nas fontes de consultas bibliográficas, sendo o primeiro deles de 1961 e o mais recente de dezembro de 2014 (JARRET *et al*, 1961; BASSETO *et al*, 2014). Muito destas tentativas de induzir imunoproteção visa neutralizar a sua hemoglobinas, enzima fundamental para a sua nutrição. Como exemplo, cita-se a imunização de ovinos com o complexo glicoprotéico H-gal GP deste verme, conduzida por Ekosa e Smith (2010), que demonstraram que este procedimento induzia a produção de anticorpos IgG e IgE específicos contra a referida hemoglobinas, desta forma aumentando a imunoproteção nos animais testados.

### 3.1.3 A Resposta Imune por Linfócitos T CD4<sup>+</sup>

Na década de 1990 foram publicados os primeiros trabalhos evidenciando o envolvimento dos linfócitos CD4<sup>+</sup> na resposta imune adaptativa contra *Haemonchus contortus* (GILL *et al*, 1994; JACOBS *et al*, 1995). Estes autores constataram que após infecção experimental com larvas deste parasita, ocorreu aumento na quantidade destas células na parede da mucosa do abomaso, nos linfonodos drenantes do abomaso e na corrente sanguínea. Animais experimentalmente infectados com este verme e tratados com anticorpos monoclonais (GILL *et al*, 1993a; KARANU *et al*, 1997) contra estas células apresentaram expressiva inibição de resposta anticórpica estecífica, bem como do infiltrado de mastócitos e eosinófilos na mucosa do abomaso. Uma significativa redução de resistência à infecção por este patógeno foi também observada por Peña e colaboradores (2006) depletando a população de células CD4<sup>+</sup> em ovinos de uma raça resistente a este verme. Embora estes dados confirmem a importância dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> contra esta infecção, a sua subpopulação Th2 tem papel central neste aspecto (SHAKYA *et al*, 20016). Ademais, experimentos pioneiros com as populações Th1 e Th2 em ovinos demonstraram que enquanto estas últimas células em animais de raças resistentes ao patógeno produzem predominantemente as interleucinas 4, 5 e 13, em animais de raças sensíveis ocorre principalmente a produção de interferon- $\gamma$  (GILL *et al*, 2000). Estudo mais recente com linhagens de células dendríticas ovinas tem demonstrado que enquanto antígenos de *Salmonella* induzem *in vitro* a produção de interferon- $\gamma$  e interleucina-17 por estas células, o estímulo com antígenos secretados por pelo *Haemonchus contortus* induz a expressão de interleucina-4 e interleucina-13 (OLIVIER *et al*, 2013),

entretanto, particularmente em relação à interleucina-17, estudos utilizando *microarrays* para a expressão de diversos genes de citocinas evidenciaram a expressão bem mais intensa do gene desta citocina em relação aos demais, em tecidos de mucosa de abomaso de ovinos infectados com este parasita (MACKINNON *et al*, 2009). Estudos também recentes com estes mesmos animais portadores de infecção com este helminto têm demonstrado a necessidade de conversão de células CD4<sup>+</sup> produtoras de interleucina-17 (Th17) se transformam em células CD4<sup>+</sup> do folículo linfóide (Thf) para que possa ocorrer a maturação de linfócitos B IgA<sup>+</sup> específicos para este parasita (MILPIED & MCHEYZER-WILLIAMS, 2013). Dados controversos foram relatados em experimentos similares com o helminto *Teladorsagia circumcincta*, também de parasitismo em abomaso e bastante correlacionado com o *Haemonchus contortus*, onde a avaliação quantitativa pela reação em cadeia da polimerase da expressão das citocinas interleucina-6, interleucina-21 e interleucina-23 em tecidos de linfonodo drenante de abomaso demonstrou correlação positiva com OPG e negativa com os níveis séricos de IgA (GOSSNER *et al*, 2012). Estes resultados, segundo os mencionados autores, são concordantes com a hipótese de que a população Th17 destes linfócitos tem ação inibitória sobre a resposta imune contra este verme.

### **3.2 Evidências de Regulação Negativa Th1 nas Infecções Helmínticas**

O primeiro trabalho abordando a regulação negativa exercida pela infecção helmíntica sobre a resposta imune a resposta imune do perfil Th1, publicado no início da década de 1990, utilizou como base experimental, a vacinação de murinos com larvas de *Schistosoma mansoni*. Neste estudo observou-se que a indução de resposta Th2 pelos ovos deste parasita inibia a resposta protetora exercida por mecanismos Th1, contra as larvas deste platelminto (PEARCE *et al*, 1991). Ainda no mesmo ano, outra importante publicação apresentou resultados, também com a utilização de camundongos vacinados com o mesmo antígeno, onde ficou claro que a inibição de mecanismos Th1 decorria da ação da citocina interleucina-10. Demonstrou ainda que a inibição *in vitro* da produção desta citocina por células esplênicas destes animais, através do bloqueio por anticorpos monoclonais contra ela dirigidos, permitia uma expressiva produção de interferon- $\gamma$  (SHER *et al*, 1991). Também trabalhando no modelo murino, dois

anos depois, pesquisadores do mesmo grupo demonstraram pela primeira vez que na co-infecção entre este helminto e o vírus da vacínia expressando proteínas do HIV-1, a persistência deste último se alongava por grande período, em contraste com a sua rápida eliminação na ausência da co-infecção com o helminto. Esta incapacidade de eliminar o vírus decorreu da inibição da atividade citotóxica de linfócitos CD8<sup>+</sup> pela mencionada interleucina-10 (ACTOR *et al*, 1993).

A partir destes trabalhos, novos importantes estudos trouxeram mais evidências desta regulação negativa. Experimentos com camundongos Balb/c infectados concomitantemente com *Fasciola hepática* e *Bordetella pertussis* demonstraram que estes animais apresentaram progressão rápida da infecção bacteriana, cuja contenção é dependente de mecanismos Th1. Tal ocorrência não se verificou nos animais apenas infectados com a bactéria nem naqueles co-infectados, mas *knockout* para o gene da interleucina-4 (BRADY *et al*, 1999). Fox e colaboradores (2000) mostraram utilizando o modelo murino, que a atrofia da mucosa gástrica decorrente da infecção pelo *Helicobacter pylori*, sabidamente induzida por citocinas Th1, de ampla progressão em animais sem co-infecção, regredia nos animais co-infectados com helmintos intestinais. Apresentando uma revisão de artigos publicados ao longo da década de 1990 sobre a inibição da resposta imune principalmente contra o HIV ou contra *Mycobacterium tuberculosis* por helmintos ou por outros parasitas, Bentwich e colaboradores (1999) perguntaram: “*Can eradication of helminthic infections change the face of AIDS and tuberculosis?*”. Seguindo a mesma linha de questionamento, numa revisão apresentando evidências de que a infecção por helmintos pode trazer vantagens para o hospedeiro, com a redução do processo inflamatório, como por exemplo em doenças alérgicas, ou desvantagens, como na co-infecção com HIV e o Bacilo de Koch, Bundy e colaboradores (2000) também formularam a seguinte pergunta como título de seu artigo: *Good Worms or Bad Worms: Do Worm Infections Affect the Epidemiological Patterns of Other Diseases?* Nesta mesma época, revisando as conseqüências da hiperestimulação Th2, através da abordagem dos principais mecanismos de estimulação por este perfil de citocinas que podem resultar em alterações no desenvolvimento de atopias e de outros processos inflamatórios também desencadeados por resposta Th2, Yazdanbakhsh e colaboradores, retomando a idéia inicial de Strachen (1989), discutem as bases da “Hipótese da Higiene”, a qual em resumo postula que a infecção parasitária reduz as manifestações inflamatórias, presentes, por exemplo, nas mencionadas

atopias (YAZDANBAKHS, 1999; YAZDANBAKHS *et al*, 2001, 2002). No que se refere a esta hipótese, outra importante publicação, também desta época, traz resultados obtidos no modelo de encefalite autoimune experimental murina (SEWELL *et al*, 2002), evidenciando que a co-infecção *Schistosoma-Mycobacterium* afeta o curso deste processo inflamatório. Dos primeiros trabalhos de Yazdanbakhsh até o presente, centenas de artigos disponíveis nas fontes de consulta bibliográficas abordam esta proposta. Publicações recentes continuam trazendo contribuições para esta hipótese, como o trabalho de Figueiredo e colaboradores (2013), realizado na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, o qual confronta, utilizando uma amostra de 1127 crianças, fenótipos imunológicos, informações sobre hábitos e condições de vida e quadros alérgicos. Outra recente publicação (HESSELMAR *et al*, 2015) com base em inquérito epidemiológico com 1029 crianças, mostra que em famílias onde a lavagem de pratos é manual ocorre bem menos doenças alérgicas em crianças do que aquelas que utilizam a lavagem em máquinas automáticas. Os autores sugerem que a maior exposição a patógenos no primeiro caso, reduz a possibilidade de alergias.

No que se refere às diferentes possibilidades de co-infecções e suas conseqüências sobre o curso de cada infecção isoladamente, dos trabalhos referidos anteriormente e datados do início do século XXI até o presente, também é grande a quantidade de publicações que trazem novos esclarecimentos sobre estas relações, mecanismos e conseqüências para o hospedeiro, algumas delas apontando possibilidades terapêuticas. Dentre elas como exemplo destaca-se uma consistente revisão de Helmbj (2009), que depois de explorar com muitos exemplos a influência positiva ou negativa da infecção helmíntica para o hospedeiro humano ou animal de experimentação, apresenta 15 variáveis que necessitam de melhores esclarecimentos, desde questões inerentes à biologia parasitária, a questões genéticas do hospedeiro ou a formulações de abordagens experimentais que possam oferecer respostas. Este autor finaliza o seu artigo questionando: *So the question remains: are helminths friend or foe?* Outra recente publicação aborda os efeitos da infecção helmíntica sobre o curso da tuberculose humana incluindo relações desde a vida fetal (CHATTERJEE & NUTMAN, 2015). Estes autores também focalizam os aspectos de resposta imune em torno do balanço Th1, Th2 e Treg e como base da capacidade helmíntica de subverter a imunidade contra *Mycobacterium tuberculosis* e finalizam apontando a necessidade de novos conhecimentos para que se avance para uma adequada resolução.

Finalmente, não poderia deixar de ser registrada a existência de muitos relatos na literatura sobre a ativação alternativa de macrófagos, desde a revisão de Gordon (2003), mais recentemente revista (MARTINEZ *et al*, 2009; GORDON & MARTINEZ, 2010), e os experimentos de Osborne e colaboradores (2014), bem como os de Reese e colaboradores (2014), que em trabalhos complementares no modelo murino helminto-vírus, colocam luzes nos mecanismos entre a hiperativação Th2 e a inibição Th1, identificando moléculas, como a Ym1, um dos produtos da ativação alternativa de macrófagos dependente de STAT-6, como possivelmente um dos mediadores desta inibição.

Experimentos atualmente em curso em nosso laboratório, ainda não publicados, abordando aspectos da resposta imune na co-infecção *Haemonchus contortus* versus *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos e em caprinos, certamente trarão informações sobre os possíveis efeitos da forte estimulação Th2 exercida por este helminto, como reportada anteriormente nesta revisão, sobre o curso da infecção pela referida bactéria.

#### **4. Conclusões**

A bibliografia abordada nesta revisão, obtida pelas palavras-chaves já referidas, apresenta informações sobre a resposta imune inata e adaptativa contra o helminto *Haemonchus contortus* que evidenciam os seus decisivos papéis para a eliminação rápida ou tardia deste verme, além de também demonstrarem a forte estimulação de mecanismos Th2 por ele desencadeada, e suas importantes conseqüências para o seu controle. Por outro lado, é também abordado o efeito desta forte estimulação Th2 sobre a resposta Th1, em modelos de animais de experimentação ou em humanos, demonstrando-se que embora se necessite de novos conhecimentos para a melhor compreensão desta regulação negativa, as informações atuais permitem se concluir que a infecção helmíntica possibilita a maior progressão de uma infecção concomitante que dependa principalmente da mencionada resposta Th2 para o seu controle.

## 5. Referências Bibliográficas

ACTOR, J.; SHIRAIT, M; KULLBERGT, M.; MARK, R.; BULLERT, L; SHER, A.; Berzofskyt, J. Immunology Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:948-952, 1993.

ALBA-HURTADO, F.; MUÑOZ-GUZMÁN, M. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. **BioMed Research International** 2013:1-10, 2013.

BALIC, A.; BOWLES, M.; MEEUSEN, E. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Parasite Immunology**, 24(1):39–46, 2002.

BASSETTO, C.; PICHARILLO, M.; NEWLANDS, G.; SMITH, W.; FERNANDES, S.; SIQUEIRA, E.; AMARANTE, A. Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. **Int J Parasitol.** 44(14):1049-54, 2014.

BEHM, C.; OVERTON, K. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. **Parasitology Today**, 16(5):202–209, 2000.

BENTWICH, Z., KALINKOVICH, A., WEISMAN, Z. BORKOW, N., BEYERS, N., BEYERS, A. Can eradication of helminthic infections change the face of AIDS and tuberculosis? **Immunology Today**, 20(11):485-7, 1999.

BOWLES, V.; BRANDON, M.; MEEUSEN, E. Characterization of local antibody responses to the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. **Immunology**. 84;(4):669–674, 1995.

BRADY, M.; O'NEILL, S.; DALTON, J.; MILLS, K. *Fasciola hepatica* Suppresses a Protective Th1 Response against *Bordetella pertussis*. **Infection and Immunity**, 67(10) 5372, 1999.

BUNDY, D, SHER, A., MICHAEL, E. Good Worms or Bad Worms: Do Worm Infections Affect the Epidemiological Patterns of Other Diseases? **Parasitology Today**, 16(7):273-4, 2000.

CHATTERJEE, S, NUTMAN, T. Helminth-Induced Immune Regulation: Implications for Immune Responses to Tuberculosis. **Plos Pathogens**, 11(10):1-6, 2015

CROTTY S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). **Annu Rev Immunol**. 29:621-63, 2011.

CUENCA-VERDE, J.; BUENDÍA-JIMÉNEZ, G.; VALDIVIA-ANDA, J.; CUÉLLAR-ORDAZ, M.; MUÑOZ-GUZMÁN, F., ALBA-HURTADO, F. Decrease in establishment of *Haemonchus contortus* caused by inoculation of a *Taenia hydatigena* larvae vesicular concentrate. **Veterinary Parasitology**, 177(3-4):332–338, 2011.

DE LA CHEVROTIÈRE, C.; BAMBOU, J.; ARQUET, R.; JACQUIET, P.; MANDONNET, N. Genetic analysis of the potential role of IgA and IgE responses against *Haemonchus contortus* in parasite resistance of Creole goats. **Vet Parasitol**. 186(3-4):337-43. 2012.

DORCHIES, P.; BERGEAUD, J.; VAN KHANH, N.; MORAND, S. Reduced egg counts in mixed infections with *Oestrus ovis* and *Haemonchus contortus*: influence of eosinophils? **Parasitology Research**, 83(7):727–730, 1997.

EKOJA, S.; SMITH, W. Antibodies from sheep immunized against *Haemonchus contortus* with H-gal-GP inhibit the haemoglobinase activity of this protease complex. **Parasite Immunol**. 32(11-12):731-8,. 2010.

EYERICH, S.; EYERICH, K.; PENNINO, D.; CARBONE, T.; NASORRI, F.; PALLOTTA, S.; CIANFARANI, F.; ODORISIO, T.; TRAILD-HOFFMANN, C.; BEHRENDT, H.; DURHAM, S.; SCHMIDT-WEBER, C.; CAVANI, A. Th22 cells represent a distinct human

T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. **J Clin Invest.** 119(12): 3573–3585, 2009.

FIGUEIREDO, C., AMORIM, L., ALCANTARA-NEVES, N., MATOS, S.; COOPER, P., RODRIGUES, L., BARRETO, M. Environmental conditions, immunologic phenotypes, atopy, and asthma: New evidence of how hygiene hypothesis operates in Latin America. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.** (13)-00, 2013.

FOX, G.; BECK, P.; DANGLER, C.; WHARY, M. WANG, T. NING, H.; CATHRYN, M.; ANDERSON, N. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. **Nature Medicine** 6: 536 – 542, 2000.

GILL, H. Cell-mediated immunity in merino lambs with genetic resistance to *Haemonchus contortus*, **International Journal for Parasitology.** 24(5):749–756, 1994.

GILL, H.; ALTMANN, K.; CROSS, M.; HUSBAND, A. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Immunology**, 99(3):458–463, 2000.

GILL, H.; HUSBAND, A.; WATSON, D. Localization of immunoglobulin-containing cells in the abomasum of sheep following infection with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** 31(1-2):179–187, 1992.

GILL, H.; WATSON, D.; BRANDON, R. Monoclonal antibody to CD4+ T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. **Immunology**, 78(1):43–49, 1993a.

GILL, H.; GRAY, G.; WATSON, D.; HUSBAND, A. Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. **Parasite Immunol.** 15(2):61-7, 1993.

GONZÁLEZ, J.; HERNÁNDEZ, A.; MEEUSEN, E.; RODRÍGUEZ, F.; MOLINA, J.; JABER, J.; RAADSMA H.; PIEDRAFITA, D. Fecundity in adult *Haemonchus contortus* parasites is correlated with abomasal tissue eosinophils and  $\gamma\delta$  T cells in resistant Canaria Hair Breed sheep. **Vet Parasitol.** 178(3-4):286-92, 2011.

GORDON, S. Alternative Activation of Macrophage. **Nature Reviews of Immunology**, 3:23-35, 2003.

GORDON, S. and MARTINEZ, F. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. **Immunity**, 32:593-604, 2010.

GOSSNER, A.; VENTURINA, V.; SHAW, J.; PEMBERTON, J.; HOPKINS, J. Relationship between susceptibility of Blackface sheep to *Teladorsagia circumcincta* infection and an inflammatory mucosal T cell response. **Veterinary Research**, 46:23, 2012.

HARRINGTON, L.; ROBIN, D.; HATTO, H.; MANGAN, P.; TURNER, H.; MURPHY, T.; MURPHY, K.; WEAVER, C. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunol.** 6:1123–1132, 2005.

HELMBY, H. Helminths and our immune system: Friend or foe? **Parasitology International**, 58:121-7, 2009

HESELMAR, B., HICKE-ROBERTS, A., WENNERGREN, G. Allergy in Children in Hand Versus Machine Dishwashing. **Pediatrics**, 135(3):e2-11

HINE, B.; HUNT, P.; BEASLEY, A.; WINDON, R.; GLOVER, S.; COLDITZ, I. Selective transport of IgE into ovine mammary secretions. **Res Vet Sci.** 89(2):184-90, 2010.

HOBERG, E.; LICHTENFELS, J.; GIBBONS, L. Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda: *Trichostrongyloidea*): Considerations of their Evolutionary History and Global

Biogeography among *Camelidae* and *Pecora* (*Artiodactyla*). **J. Parasitol.** 90: 1085–1102, 2004.

HOHENHAUS, M.; OUTERIDGE, P. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. **British Veterinary Journal.** 151(2):119–140, 1995.

INGHAM, A.; MENZIES, M.; HUNT, P.; REVERTER, A.; WINDON, R.; ANDRONICOS, N. Divergent ghrelin expression patterns in sheep genetically resistant or susceptible to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, 181(2–4):194–202, 2011.

JACOBS, H., ASHMAN, K.; MEEUSEN, E. Humoral and cellular responses following local immunization with a surface antigen of the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 48(3-4):323–332, 1995.

JARRETT, W.; JENNINGS, F.; MCINTYRE, W.; MULLIGAN, W.; SHARP, N. Studies on immunity to *Haemonchus contortus* infection - double vaccination of sheep with irradiated larvae.

**Am J Vet Res.** 22:186-8, 1961.

KARANU, F.; MCGUIRE, T.; DAVIS, D.; BESSER, T.; JASMER, D. CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. **Parasite Immunology**, vol. 19, no. 10, pp. 435–445, 1997.

KOOYMAN, F. Protection in lambs vaccinated with *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG1 antibody. **Parasite Immunology.** 22(1):114, 2000.

MACKINNON K.; BURTON, J.; ZAJAC, A.; NOTTER, D. Microarray analysis reveals difference in gene expression profiles of hair and wool sheep infected with *Haemonchus contortus*. **Vet Immunol Immunopathol.** 130(3-4):210-20, 2009.

MARTINEZ, F.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Ann. Rev. Immunol.** 27:451-83, 2009.

MCSORLEY, H.J.; MAIZELS, R. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 25, p. 585–608, 2012.

MCALEESE, S.; MILLER, H. Cloning and sequencing of the equine and ovine high-affinity IgE receptor beta-and gamma-chain cDNA. **Immunogenetics.** 55(2):122-5, 2003.

MEEUSEN, E.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? **Parasitology Today**, 16(3):95–101, 2000.

MEEUSEN, E.; BALIC, A.; BOWLES, A. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 108(1-2):121–125, 2005.

MELO, A. Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no Estado do Ceará, Brasil. **Tese de Doutorado, Universidade Federal da Ceará**, 2005.

MILLER, R. Prospects for the immunological control of ruminant gastrointestinal nematodes: natural immunity, can it be harnessed? **International Journal for Parasitology**, 26(8-9): 801–811, 1996.

MILPIED, P.; McHeyzer-Williams, M. High-affinity IgA needs TH17 cell functional plasticity. **Nature Immunology**, 14(4):313, 2013.

MOSMANN, T.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.; GIEDLIN, M.; COFFMAN, R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol.** 136:2348–2357, 1986.

MUÑOZ-GUZMÁN, M.; CUENCA-VERDE, C.; VALDIVIA-ANDA, G.; CUÉLLAR-ORDAZ, A.; ALBA-HURTADO, F. Differential immune response between fundic and pyloric abomasal regions upon experimental ovine infection with *Haemonchus contortus*. **Vet Parasitol.** 185(2-4):175-80, 2012.

OLIVIER, M.; FORET, M.; LE VERN, M.; KERBOEUF, D.; GUILLOTEAU, L. Plasticity of Migrating CD1b<sup>+</sup> and CD1b<sup>-</sup> Lymph Dendritic Cells in the Promotion of Th1, Th2 and Th17 in Response to *Salmonella* and Helminth Secretions. **Plos One**, 8(11):1-11, 2013.

OSBORNE, L.; MONTICELLI, L.; NICE, T.; SUTHERLAND, T.; SIRACUSA, M.; HEPWORTH, M.; TOMOV, V.; KOBULEY, D.; TRAN, S.; BITTINGER, K.; BAILEY, A.; LAUGHLIN, A.; BOUCHER, J.; WHERRY, E.; BUSHMAN, F.; ALLEN, J.; VIRGIN, H.; ARTIS, D. Virus-helminth coinfection reveals a microbiota-independent mechanism of immunomodulation. **Science**, 345(6196):578-82, 2014.

PEARCE, E.; CASPAR, P.; GRZYCH, J.; LEWIS, F.; SHER, A. Downregulation of Th1 Cytokine Production Accompanies Induction of Th2 Responses by a Parasitic Helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, 173:159-166, 1991.

PEÑA, M.; MILLER, J.; HOROHOV, D. Effect of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection, **Veterinary Parasitology**. 138(3-4):240-246, 2006.

PÉREZ, J.; GARCIA, P.; SANTIAGO, H.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; DE LAS MULAS, J.; CÁMARA, S. Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Vet. Res.** 32:463-473, 2001.

PEREZ-MAZLIAH, D.; LANGHORNE, J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. **Front Immunol.** 5:671, 2015.

REESE, T.; WAKEMAN, B.; CHOI, H.; HUFFORD, M.; HUANG, S.; ZHANG, X.; BUCK, M.; JEZEWSKI, E.; KAMBAL, K.; LIU, C.; GOEL, G.; MURRAY, P.; XAVIER, R.; KAPLAN, H.; RENNE, R.; SPECK, S.; ARTYOMOV, M.; PEARCE, E.; VIRGIN, H. Helminth infection reactivates latent  $\gamma$ -herpesvirus via cytokine competition at a viral promoter. **Science** 345:573, 2014.

REINHARDT, I. SCOTT, AND H. V. SIMPSON, "Neutrophil and eosinophil chemotactic factors in the excretory/secretory products of sheep abomasal nematode parasites—NCF and ECF in abomasal nematodes. **Parasitology Research**, 109(3):627–635, 2011.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, H.; SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; SAKIHAMA, T.; ITOH, M.; KUNIYASU, Y.; NOMURA, T.; TODA, M.; TAKAHASHI, T. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.** 182:18–32, 2001.

SCHALLIG, H.. Immunological Response of Sheep to *Haemonchus contortus*. **Parasitology**. 120(7): 63-72, 2000.

SEWELL, D., REINKE, E., HOGAN, L., SANDOR, M., FABRY, Z. Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. **Immunology Letters** 82 (2002) 101/110.

SHAKYA, K.; MILLER, J.; LOMAX, L.; BURNETT, D. Evaluation of immune response to artificial infections of *Haemonchus contortus* in Gulf Coast Native compared with Suffolk lambs. **Veterinary Parasitology**, 181(2–4):239–247, 2011.

SHAKYA, K.; MILLER, J.; HOROHOV, D. A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Vet Parasitol.*, 163(1-2):57-66, 2009.

SHER, A.; FIORENTINO, D.; CASPAR, P.; PEARCE, E.; MOSMANN, T. Production of IL-10 by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol*, 147:2713-6, 1991.

SMITH, W.; CHRISTIE, M. *Haemonchus contortus*: local and serum antibodies in sheep immunised with irradiated larvae. *International Journal for Parasitology*. 8:219–223, 1978.

STRACHAN, D. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299:1259, 1989.

VAN DIE, I.; GOMORD, V.; KOOYMAN, N.; VAN DEN BERG, T.; CUMMINGS, R.; VERVELDE, L. Core  $\alpha$ 1  $\rightarrow$  3-fucose is a common modification of N-glycans in parasitic helminthes and constitutes an important epitope for IgE from *Haemonchus contortus* infected sheep. *FEBS Letters*, 463(1-2):189–193, 1999.

VELDHOEN, M.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, J.; HELMBY, H.; WESTENDORF, A.; BUER, J.; MARTIN, B.; WILHELM, C.; STOCKINGER, B. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 9(12):1341-6, 2008.

YAZDANBAKHSI, M. Common features of T cell reactivity in persistent helminth infections: lymphatic filariasis and schistosomiasis. *Immunology Letters*, 65:109–115, 1999.

YAZDANBAKHSI, M., BIGGELAAR, A., MAIZELS, R. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *TRENDS in Immunology*, 22 (7):41, 2001.

YAZDANBAKHSI, M.; KREMSNER, P.; VAN REE, R. Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science*, 296:490, 2002.