



RENORBIO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS INDUZIDA POR DUAS CEPAS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS
ASSOCIADOS**

Miriam Flores Rebouças

Salvador – Bahia

2014



RENORBIO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia

PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS INDUZIDA POR DUAS CEPAS DE

***Corynebacterium pseudotuberculosis* E CARACTERIZAÇÃO**

DE LIPÍDIOS ASSOCIADOS

Miriam Flores Rebouças

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

Co-orientador: Ricardo Portela

Salvador – Bahia

2014

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

R292 Rebouças, Miriam Flores

Produção de quimiocinas induzidas por duas cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e caracterização de lipídios associados. / Miriam Flores Rebouças. – Salvador, 2014.

81 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação
na Rede Nordeste de Biotecnologia, 2014.

1. Linfadenite Caseosa 2. Quimiocinas 3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. I. Meyer, Roberto. 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) 3283-8921-3247-6269-E-mail: renorbioba@hotmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Miriam Flores Rebouças

TÍTULO DO PROJETO: "PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS INDUZIDA POR DUAS CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS ASSOCIADOS"

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento
PROFESSOR CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento – UFBA
(Orientador)

Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela - ICS/UFBA
(Co-orientador)

Profª Drª Samira Abdallah Hanna - ICS/UFBA
(Examinadora)

Profª Drª Lilia Ferreira de Moura Costa – UFBA
(Examinadora)

Profª Drª Juliana Perrone Bezerra de Menezes
(CPqGM/FIOCRUZ)
(Examinadora)

Profª Drª Stella Maria Barrouin Melo (EMEV -UFBA)
(Examinadora)

CONCEITO

ASSINATURA

SATISFATORIO

SATISFATORIO

Satisfatório

SATISFATORIO

Satisfatório

Satisfatório

DATA DA DEFESA DE TESE: 29 de agosto de 2014

HORÁRIO: 14hs

LOCAL: Auditório III no 2º andar

ICS/UFBA

Aos meus pais,

Geraldo dos Santos Rebouças e Mariete Flores Melo Rebouças,

*que por uma vida de dedicação, amor e
trabalho, sempre possibilitaram a seus filhos a
oportunidade de realizar sonhos e conquistas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença, luz e força, sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que me destina.

A meu orientador Prof. Dr. ROBERTO MEYER, agradeço pelos ensinamentos, paciência, confiança, incentivo, atenção e apoio profissional. Ao meu co-orientador Prof. Dr. RICARDO PORTELA pela orientação, pelos valiosos conhecimentos e disponibilidade.

A minha mãe e meu pai pelo cuidado, paciência, amizade, amor, pelos ensinamentos e pelo exemplo de honestidade. Meus irmãos, Danilo e Guido, pela amizade e incentivo. Minha sobrinha Júlia, pelos momentos de alegria. Além de minha cunhada Glória, sempre sorridente e prestativa. A meus familiares sempre presentes e dando apoio, principalmente a minha madrinha Heloisa Flores.

A Ivenis, que tem fundamental importância na minha vida, obrigada pelo seu amor, compreensão e carinho que aumentam meus momentos de prazer. Obrigada também por Tainá e pela família maravilhosa que me apresentou.

A meus amigos, feliz por possuir muitos, família que eu escolhi e que me enchem de energia para seguir confiante na vida. Apesar de todos serem importantes, em relação a essa tese tenho que salientar Fernanda Sousa – FIOCRUZ/BA pelas contribuições em vários momentos desse trabalho. As meninas do Vale, principalmente Flávia e minha prima Telli por me escutarem muito nessa trajetória, além de Ana Carla e todos que iluminam meu caminho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório (LABIMUNO/ICS-UFBA) pelos anos de apoio e momentos partilhados juntos, principalmente Andréia Pacheco, Bruno Bastos, Danielle Dantas, Gabriele Rodrigues, Marcus Silva, Mariana Assis, José Tadeu Raynal, Tatiane Sales.... Assim como a equipe do LABIMUNO, todos indispensáveis para execução desse trabalho, em especial a D. Chica, sempre disposta e alegre.

Ao curso de Doutorado em Biotecnologia, a todos os professores, funcionários e colegas, pelos momentos de descontração e aprendizado.

Ao Banco do Nordeste, FAPEX e FAPESB, pelo financiamento do projeto.

A todos aqueles que auxiliaram e/ou participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, meus agradecimentos. Assim como a quem utilize esse trabalho dando um sentido ainda maior a essa conquista.

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	14
2. 1. Linfadenite caseosa	
2.1.1. Doença	
2.1.2. Aspectos epidemiológicos	
2.1.3. Tratamento e controle	
2.2. Histórico	
2. 3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
2. 3. 1. Classificação	
2. 3. 2. Características morfológicas, tintoriais e bioquímicas	
2. 3. 4. Fatores de virulência	
2. 3. 5. Lipídios de superfície	
2. 3. 6. Transmissão	
2. 3. 7. Patogenia	
2. 3. 8. Diagnóstico	
2. 3. 9. Resposta imune a <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
3. Justificativa.....	23
4. Hipótese.....	23
5. Ojetivos.....	24
5. 1. Objetivos gerais	
5. 2. Objetivos específicos	
4. Manuscrito 1.....	25
5. Manuscrito 2.....	50
6. Referências bibliográficas.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – meio de infusão de cérebro e coração
CFU – unidade formadora de colônias
ELISA – ensaio de imunoadsorção enzimática
h - hora
Hz – hertz
ICS – Instituto de Ciências da Saúde
IgM – Imunoglobulina M
kDa - kilodaltons
LC – linfadenite caseosa
LM – lipomanose
LAM - lipoarabinomanose
 μg – micrograma
 μm - micrômetro
 μl – microlitros
MS – espectrometria de massas
m/s – massa/carga
PBS – salina tamponada com fosfato
PBS-T – salina tamponada com fosfato e com adição de Tween
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH – potencial de hidrogênio
PLD – fosfolipase D
PIM – fosfatidil-myo-inositol associado à manose
PWM – pokeweed
SDS-page – eletroforese em gel com dodecil-sulfato de sódio
SME – método de extração com seringa
TPP – partição por três fases
UFBA – Universidade Federal da Bahia
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
vol. – volume
X g – força gravitacional

RESUMO

PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS INDUZIDA POR DUAS CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDIOS ASSOCIADOS

A linfadenite caseosa é uma doença infecciosa que afeta principalmente caprinos e ovinos, sendo caracterizada pela formação de lesões caseosas nos linfonodos externos e internos, assim como em alguns órgãos, tais como pulmão, fígado e baço. Essa doença tem alta prevalência na caprino-ovinocultura brasileira, sendo responsável por muitas perdas econômicas. Muito da relação bactéria/hospedeiro ainda não está bem estabelecida e pouco se sabe sobre imunidade inata e sobre os componentes de parede não proteicos específicos dessa bactéria. Este trabalho teve como objetivo analisar a participação de quimiocinas na resposta a *Corynebacterium pseudotuberculosis* e verificar diferenças nesse perfil imune após estimulação com cepas de diferentes graus de patogenicidade em modelo murino. Foi realizado estímulo de esplenócitos murinos com cepas bacterianas viáveis apresentando baixa e alta patogenicidade, denominadas T1 e VD57, respectivamente, e com extratos antigênicos das mesmas cepas. Após o estímulo, foi realizada a dosagem de quimiocinas utilizando a técnica de ELISA no sobrenadante proveniente do cultivo de células. Em relação aos extratos antigênicos utilizados, o antígeno lisado de T1 teve maior capacidade de estimulação de quimiocinas. Num segundo momento, levando em consideração esse resultado, foi feita uma purificação dos antígenos lisados de ambas as cepas de *C. pseudotuberculosis* para caracterização e diferenciação de suas moléculas não proteicas. Verificou-se que o método de purificação, utilizando solventes orgânicos, cromatografia de interação hidrofóbica e extração de gel, teve êxito e que as cepas apresentam diferentes perfis lipídicos, os quais podem influenciar a patogenicidade de cada cepa, provavelmente sendo responsáveis por gerar distintos perfis de indução das quimiocinas.

Palavras-chave: Linfadenite caseosa, quimiocinas, componentes não proteicos da parede celular, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

ABSTRACT

CHEMOKINE PRODUCTION INDUCED BY TWO *Corynebacterium pseudotuberculosis* STRAINS AND CHARACTERIZATION OF ASSOCIATED LIPIDS

Caseous lymphadenitis is an infectious disease that occurs mainly in small ruminants, characterized by caseous lesions in internal and external lymph nodes, as well as in some organs such as lung, liver and spleen. This disease has a high prevalence in the Brazilian herd of sheeps and goats, provoking many economic losses. The relationship between parasite and host is unclear and little is known about innate immune response and non-proteinic components of the cell wall specific to this bacterium. The main target of this study was to analyze the involvement of chemokines in the response of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and check in murine model the differences in this immune profile after stimulation with strains presenting different degrees of pathogenicity. Balb/c splenocytes were stimulated with bacterial strains showing low and high pathogenicity, called T1 and VD57, respectively, and with antigen extracts of the same strains. After this, the chemokines were dosed by ELISA technic in supernatant of culture cells. Regarding antigens extracts used, the T1 lysate antigen had greater capacity to chemokine stimulation. In a second time, considering this result, lysate antigens of both *C. pseudotuberculosis* strains were purified for characterization and differentiation of their non-proteinic components. It was found that the method of purification using organic solvents, hydrophobic interaction chromatography and gel extraction have been successful and the strains exhibited different lipid profiles, which can influence the pathogenicity of each strain, probably being responsible for generating distinct profiles in chemokine induction.

Key-words: Caseous lymphadenitis, chemokines, non-proteinic components of the cell walls, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente causador da linfadenite caseosa (LC) em caprinos e ovinos. A LC é uma zoonose economicamente importante, que afeta amplamente pequenos ruminantes no mundo. A doença é caracterizada pela formação de granulomas nos linfonodos periféricos e, mais raramente, nos linfonodos internos e pulmões (HEIN e CARGILL, 1981). Animais doentes são reservatórios potenciais, sendo que a forma de contágio ocorre principalmente através do contato com a secreção eliminada de granulomas superficiais que se rompem nos animais com a forma clínica da doença. Esses granulomas rompidos contaminam camas e abrigos, levando à permanência do micro-organismo por longo tempo no ambiente (YERUHAM *et al.*, 1997). As perdas econômicas ocasionadas pela doença são evidenciadas através da diminuição da produção de leite, da desvalorização da pele devido às cicatrizes, da perda de peso, do comprometimento de carcaças, além da mão de obra para tratar os animais doentes (RIBEIRO *et al.*, 1991; ALVES e OLANDER, 1999).

Uma vez estabelecida no rebanho, a doença é difícil de ser erradicada, pois o uso de antibióticos não constitui uma estratégia de tratamento eficaz, tendo em vista que as drogas não penetram nos granulomas com facilidade e a drenagem desse pode levar a contaminação da pele e do ambiente, facilitando a disseminação bacteriana (NAIRN e ROBERTSON, 1974). Os granulomas internos são de difícil diagnóstico, podendo constituir focos de disseminação da doença até mesmo para outros rebanhos onde esses animais possam ser introduzidos (SCHREUDER *et al.*, 1987). O melhor método de controle é a erradicação da infecção através da identificação, quarentena e remoção de animais infectados (PRESCOTT *et al.*, 2002), só que os métodos de detecção de animais infectados têm eficiência limitada (PATON *et al.*, 1995; PAULE *et al.*, 2003).

A virulência microbiana e a patogenia da LC, muitas vezes, estão associadas à estrutura peculiar da parede celular. A camada lipídica, presente na face externa da parede, assemelha-se ao encontrado no gênero *Mycobacterium* (HARD, 1979). Essa camada impede a destruição do patógeno pelas enzimas lisossomais, permitindo que, *C. pseudotuberculosis* sobreviva dentro do macrófago, como um agente intracelular facultativo (TASHJIAN e CAMPBELL, 1983; BRAITHWAITE *et al.*, 1993). A relação entre virulência e quantidade de lipídeos na parede de *C. pseudotuberculosis* já foi evidenciada (BURELL, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983). A ampliação do

conhecimento sobre os diversos aspectos da relação entre o bacilo causador da linfadenite e o hospedeiro é fundamental para o estabelecimento de estratégias eficientes na contenção e eliminação desse agravo. Assim, o empenho para se conhecer como cepas virulentas e atenuadas de *C. pseudotuberculosis* se relacionam com o hospedeiro pode gerar informações úteis para o desenvolvimento de novas vacinas, métodos de diagnóstico e terapia efetiva, além de gerar conhecimento sobre a cinética das respostas imunes contra bactérias intracelulares.

Na dinâmica da resposta imune contra o *C. pseudotuberculosis*, acredita-se que as quimiocinas, assim como ocorre com o *Mycobacterium tuberculosis* (ALGOOD *et al.*, 2003), têm função primordial na formação e manutenção do granuloma, o qual isola fisicamente a bactéria, impedindo sua disseminação no organismo, e cria um ambiente que permite a interação das células para uma resposta imune efetiva que age na tentativa de eliminar o patógeno. Até o momento não existem estudos que avaliem a produção destas moléculas em infecções com *C. pseudotuberculosis*. Portanto, o presente trabalho avaliou a indução da produção de quimiocinas por diferentes linhagens e distintos extratos antigênicos de *C. pseudotuberculosis* em camundongos susceptíveis, traçando um perfil comportamental destas moléculas e evidenciando sua importância durante a infecção com o referido patógeno. Além disso, foram caracterizados e diferenciados lipídios purificados de duas cepas com distintas patogenicidades por se mostrarem potenciais alvos para testes de diagnóstico e imunoprofilaxia da LC na fase aguda da infecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Linfadenite caseosa

2.1. 1. A Doença

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa de caráter crônico, também conhecida como mal do caroço, possuindo como agente etiológico a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Essa doença acomete principalmente caprinos e ovinos, podendo afetar equinos (com o nome de linfangite ulcerativa), bovinos, búfalos e cervídeos (BENHAM *et al.*, 1962; BATEY, 1986).

O acometimento de humanos por *C. pseudotuberculosis* é relativamente raro. Nos casos mais graves leva a uma linfadenopatia localizada, tratada com excisão cirúrgica do linfonodo afetado. Não há relatos de infecções fatais, por isso é classificada como infecção ocupacional, pois está associada a pessoas que tenham contato constante com animais infectados. Entretanto, isto demonstra que essa bactéria apresenta potencial zoonótico (PEEL *et al.*, 1997).

Nos pequenos ruminantes, a doença caracteriza-se por um quadro de formação de granulomas nos linfonodos externos e internos e em vísceras. Entretanto, esse granuloma, torna-se um mecanismo de proteção para o patógeno, pois impede que anticorpos, bem como antibióticos, adentrem a estrutura devido à sua camada fibrosa. A drenagem ou ruptura do abscesso pode levar à contaminação do meio ambiente, além de permitir a introdução do micro-organismo causador dessa doença em animais saudáveis (NAIRN e ROBERTSON, 1974). A linfadenite caseosa normalmente acarreta perdas econômicas devido à perda de peso, redução da produção de leite, deficiência reprodutiva, podendo até levar o animal à morte. Os granulomas internos são de difícil diagnóstico, podendo constituir focos de disseminação da doença (ELLIS *et al.*, 1987).

2.1.2. Aspectos epidemiológicos

A LC ocorre em todas as áreas onde há população significativa de ovinos e caprinos no mundo, entretanto existem inúmeras dificuldades na obtenção de dados para se definir a prevalência desta doença, principalmente devido à sua característica essencialmente crônica e à sintomatologia não específica, escassa ou até mesmo

ausente. Além disso, outros agentes etiológicos levam à formação de granulomas semelhantes, tais como *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp*. Adicionalmente, na maioria dos inquéritos epidemiológicos, os dados baseiam-se em animais provenientes de abatedouros, que não são remetidos para o abate quando apresentam a forma clínica da doença (UNANIAN *et al.*, 1985).

A caprinocultura e a ovinocultura têm se destacado no agronegócio brasileiro. O rebanho ovino brasileiro está concentrado na região Sul, onde predomina a produção de lã, seguido da região Nordeste, onde a produção de carne e pele é mais relevante (IBGE, 2010). Tanto no Nordeste, que detém o maior rebanho caprino do Brasil, quanto no Sudeste, é frequente a criação concomitante de ovinos e caprinos (PINHEIRO *et al.*, 2000). No Brasil, estima-se que a maioria dos rebanhos de ovinos e caprinos esteja infectada e que a prevalência clínica varia entre 30% a 75% dos animais (FARIA *et al.*, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2011). De acordo com levantamento sorológico realizado no Estado de Minas Gerais nas espécies caprina e ovina, foram encontradas soroprevalências de 78,9% em caprinos (SEYFFERT *et al.*, 2010) e 75,8% em ovinos (GUIMARÃES *et al.*, 2011). No Distrito Federal, a prevalência encontrada foi de 44% em rebanhos comerciais de ovinos (DO CARMO *et al.*, 2012). Um dos registros de prevalência feitos na Bahia foi conduzido por Meyer (2003), no semiárido baiano, obtendo um percentual médio de 46,66%.

2. 1. 3. Tratamento e controle

Para que ocorra sucesso no controle da LC, primeiro deve-se separar os animais doentes para que não haja riscos de infectar os animais sadios. São muitas as tentativas de impedir a disseminação da doença, visto que a permanência da bactéria no solo ou em objetos em contatos com os animais torna-se uma fonte constante de propagação da mesma (BROWN E OLANDER, 1987).

Apesar do *C. pseudotuberculosis* ser sensível a muitos antibióticos, o tratamento dos animais com esses medicamentos é ineficaz, visto que a cápsula fibrótica do granuloma impede a penetração desses na lesão. A remoção cirúrgica e cuidadosa dos granulomas é a maneira mais segura de tratamento dos animais doentes (BROWN e OLANDER, 1987).

2.2. Histórico

C. pseudotuberculosis foi isolada em 1888 de um caso de linfangite bovina pelo francês Edmond Nocard. Em 1891, Preisz e Guinard isolaram um germe similar de um abscesso renal de ovelhas. Novamente Nocard, em 1893, isolou o mesmo micro-organismo a partir de uma enfermidade cutânea similar ao mormo em equinos. Preisz em 1894 descreveu 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 palavra *Corynebacterium* como nome do gênero, sendo o micro-organismo renomeado *Corynebacterium ovis*. A partir da sexta edição do Manual Berguey, em 1948, passou-se adotar a denominação atual de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BENHAM *et al.*, 1962).

2.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

2.3.1. Classificação

A bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, pertence ao gênero *Corynebacterium*, e ao mesmo grupo supragenérico dos gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardia*, que corresponde ao *Actinomycetes* (WILLIAMSON, 2001; DORELLA *et al.*, 2006; D'AFONSECA *et al.*, 2008). Os estudos de hibridização DNA-DNA e da seqüência do RNA ribossômico 16S demonstram que *Corynebacterium pseudotuberculosis* pertence ao mesmo gênero que *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* (TAKAHASHI *et al.*, 1997). Em 1971, Biberstein e colaboradores sugeriram a existência de dois biotipos de *C. pseudotuberculosis*, baseados na capacidade de reduzir ou não nitrato em nitrito. Em 1988, Songer e colaboradores confirmaram estes resultados e propuseram os nomes de biotipo *equi*, nitrato redutase positivo, isolado de cavalos e bovinos, e biotipo *ovis*, nitrato redutase negativo, isolado de pequenos ruminantes e bovinos.

2.3.2. Características tintoriais, morfológicas e bioquímicas

C. pseudotuberculosis é caracterizada como um bacilo Gram positivo, intracelular facultativo de macrófagos (embora possa infectar outras células), pleomórfico, imóvel, não esporulado e anaeróbico facultativo, possuindo dimensões que variam entre 0,5 a 0,6 µm de diâmetro e 1 a 3 µm de comprimento. A bactéria em cultivo laboratorial pode se apresentar isolada ou formando grupamentos, pequenos, brancos e secos (BATEY, 1986; DORELLA *et al.*, 2006; VALDIVIA, *et al.*, 2012). É um micro-organismo mesofílico, cuja temperatura ideal de crescimento é 37°C, e pH ideal entre 7,0 e 7,2, requerendo um período de incubação de 48 a 72 horas (MOURA-COSTA, 2002).

O micro-organismo apresenta uma grande capacidade fermentativa, sendo capaz de utilizar para tal propriedade uma variada fonte de carboidratos como a glicose, frutose, manose, maltose e sacarose com produção de ácido, entretanto sem a produção de gás. Mostra-se positiva para os testes de catalase, urease e fosfolipase D, porém negativa para os testes de oxidase, esculina, hidrólise de gelatina, digestão da caseína e fermentação da lactose. A redução de nitrato é variável, não sendo geralmente observada em estirpes isoladas de pequenos ruminantes (biovar *ovis*) e sim a partir do isolamento de equinos e bovinos (biovar *equi*) (MOURA-COSTA, 2002).

Embora seja uma bactéria beta-hemolítica, a hemólise ao redor das colônias é variável, podendo não ser observada no período de 48 a 72hs. Quando se acrescenta ao meio o detergente *Tween* 80, a atividade hemolítica das cepas é favorecida, assim como grandes zonas de hemólise se desenvolvem na presença de *Rhodococcus equi* (BAIRD e FONTAINE, 2007).

2.3.3. Fatores de virulência

A patogenia dessa bactéria ainda não está completamente esclarecida, mas fatores de virulência já foram descritos, como os lipídios de superfície e a exotoxina fosfolipase D (PLD), importantes na imunopatogenia da doença (BROWN e OLANDER, 1997). A PLD vem sendo identificada como uma potente exotoxina de *C. pseudotuberculosis* e um fator chave para o desenvolvimento da LC. Diversos estudos usando a exotoxina bruta ou parcialmente purificada demonstraram que a atividade da

PLD sobre a esfingomiéline, que constitui a membrana das células do endotélio vascular, parece ser importante no processo de disseminação dessa bactéria da área infectada para os linfonodos, por aumento de permeabilidade capilar. Bactérias sem a expressão desse gene não são capazes de disseminar a doença no organismo do hospedeiro (McNAMARA *et al.*, 1994). Similarmente, a presença de anticorpos específicos para PLD limita o progresso da doença clínica (ALVES e OLANDER, 1999; BAIRD *et al.*, 2007).

Os lipídios de superfície de *C. pseudotuberculosis* dificultam a fagocitose da bactéria, resistindo a enzimas lisossômicas e permitindo a sua sobrevivência dentro da célula (WILLIANSO, 2001). Uma relação entre virulência e a quantidade de lipídios na parede de *C. pseudotuberculosis* foi evidenciada em infecções experimentais, tanto em camundongos como em ovinos, mostrando que quanto maior o conteúdo lipídico, maior a capacidade de formar granulomas (BURRELL, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983).

2. 3. 4. Lipídios de superfície

Uma característica interessante de *C. pseudotuberculosis* é o alto teor de lipídios no seu envoltório celular, constituindo até 40% do seu peso, além de conferir propriedades tintoriais únicas, que ajudam no diagnóstico de amostras clínicas infectadas, e ser importante na interação parasito-hospedeiro. Jolly (1966) atribui à presença destes lipídios a formação de flocos característicos em meio líquido. Essa grande quantidade de lipídios aumenta a resistência da bactéria a digestão por enzimas celulares, dificulta a fagocitose, aumentando sua virulência e patogenicidade (JOLLY, 1966; BROWN e OLANDER, 1987). Os lipídios contribuem também para a resistência contra agentes antimicrobianos e resistência a agentes ácidos ou alcalinos, tanto no ambiente intracelular, como extracelular (DHEDA *et al.*, 2010).

Segundo Williamson (2001), os lipídios celulares bacterianos têm característica piogênica e este fator de virulência está associado com a formação de granulomas. Em trabalhos experimentais, tanto em camundongos quanto em ovinos, houve alta relação entre conteúdo lipídico das linhagens testadas e capacidade de formar granulomas (BURRELL, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983).

Lipídios associados a açúcares tornam-se um fator de virulência que vem sendo estudado e relacionado com a imunopatogenicidade de *C. pseudotuberculosis*, ao quais são: âncoras de fosfatilmioinositol associado à manose (PIMs), lipomanano (LM) e lipoarabinomanano (LAM). Esses são os mais abundantes glicocolipídios de importância médica e médica veterinária (MISHRA *et al.*, 2008) descritos no gênero e reagem com anticorpos IgM, sendo capazes de reconhecer a infecção ainda na fase inicial (GIRALDO *et al.*, 2000).

2. 3. 5. Transmissão

A transmissão da LC pode ocorrer pelo contato do animal sadio com objetos contaminados do meio ambiente ou por contato direto com animais doentes apresentando granulomas superficiais ou pulmonares com exsudação (ELLIS *et al.*, 1987), instrumentos ou soluções de banho, o solo e/ou vegetação contaminados (NAIRN e ROBERTSON, 1974; CARNE, 1978). O agente etiológico da linfadenite é capaz de sobreviver por até oito semanas no meio ambiente sem, no entanto, se multiplicar. Como micro-organismo pode alojar-se em superfícies e continuamente infectar animais por contato direto. A persistência deste micro-organismo no ambiente parece ser o principal fator responsável pela sua transmissão no rebanho (AUGUSTINE e RENSHAW, 1986).

A infecção normalmente ocorre por meio de ferimentos na pele ou na membrana mucosa, seguida pela disseminação da bactéria para os linfonodos superficiais, nos quais os granulomas normalmente se desenvolvem, ocorrendo necrose nos seus interiores. A disseminação da bactéria também pode atingir os órgãos viscerais, particularmente os pulmões, pois o micro-organismo é capaz de penetrar nesse órgão através da inalação, ou seja, por aerossóis expelidos por um animal acometido por granulomas pulmonares (BATEY, 1986; ELLIS *et al.*, 1987). As moscas também podem ser consideradas como vetores passivos do micro-organismo (NAGY, 1971; BRAVERMAN *et al.*, 1999).

2. 3. 6. Fisiopatologia e resposta imune

A bactéria utiliza como a principal porta de entrada ferimentos ou pequenas abrasões na superfície da pele dos pequenos ruminantes (DORELLA *et al.*, 2006;

BAIRD e FONTAINE, 2007). Após a entrada, ocorre a formação de pequenas lesões granulomatosas no local de acesso, comumente na região subcutânea, ou nos linfonodos superficiais, originando a LC externa ou superficial. À medida que o micro-organismo se dissemina, utilizando a via linfática ou sanguínea, as lesões se desenvolvem em órgãos internos, comumente nos linfonodos mediastínicos ou nos pulmões, entretanto qualquer órgão pode ser acometido sendo essa forma conhecida como LC visceral (KURIA *et al.*, 2001; BAIRD e FONTAINE, 2007).

Os granulomas da LC são resultado principalmente da resposta imune do hospedeiro, como um mecanismo que contém a disseminação deste micro-organismo. As lesões são constituídas de camadas concêntricas de macrófagos e principalmente linfócitos T CD4+ e TCD8+. Estas células estão distribuídas em torno de um centro necrótico e circundadas por uma cápsula fibrosa. O centro necrótico contém líquido necrótico de coloração variando do branco ao amarelado e/ou esverdeado que, inicialmente, é mole e semifluido, evoluindo com o tempo para uma consistência pastosa, chegando à caseosa nas lesões mais antigas (WILLIAMSON, 2001). É identificada uma semelhança entre os granulomas causados pela infecção por *C. pseudotuberculosis* e os causados por *Mycobacterium tuberculosis* (PASCUAL *et al.*, 1995).

2. 3. 7. Diagnóstico

Normalmente, o diagnóstico da LC em pequenos ruminantes é baseado no quadro clínico e na identificação microbiológica de *C. pseudotuberculosis* em material extraído dos granulomas. O diagnóstico avaliando apenas a sintomatologia é complicado, pois outros micro-organismos podem causar lesões semelhantes e o animal pode não apresentar granulomas visíveis (UNANIAN *et al.*, 1985). Já a identificação microbiológica também tem suas limitações, devido à possível contaminação do material drenado, a qual pode impossibilitar o diagnóstico.

Testes sorológicos são importantes para um controle eficiente, visto que animais infectados podem não apresentar sintomas aparentes e disseminar a infecção (KABA *et al.*, 1991). Vários testes, incluindo testes ELISA com diferentes preparações antigênicas, vêm sendo desenvolvidos para detectar anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* em pequenos ruminantes, mas a maioria dos testes não é satisfatória quando aplicados sozinhos (PATON *et al.*, 1995). Alguns testes funcionam bem

(DERCKSEN *et al.*, 2000; KABA *et al.*, 2001; REBOUÇAS *et al.*, 2013), mas geralmente possuem pequenas falhas de sensibilidade em animais que apresentam somente granulomas internos. Esses testes ainda não foram disponibilizados comercialmente (BINNS *et al.*, 2007). A dosagem de INF- γ também é um método que vem sendo estudado para se detectar a infecção por *C. pseudotuberculosis*, mas que precisa de aprimoramentos (PRESCOT *et al.*, 2002; MENZIES *et al.*, 1994; SUNIL *et al.*, 2008; REBOUÇAS *et al.*, 2011).

Técnicas de diagnóstico molecular têm trazido avanços na prática clínica das doenças infecciosas veterinárias. A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica altamente sensível e que possui um amplo potencial para detecção de patógenos (YANG e ROTHMAN, 2004), principalmente como diagnóstico complementar, por ser um método de maior custo e necessitar de laboratório e equipamentos especializados. Um ensaio de multiplex PCR foi desenvolvido por Pacheco e colaboradores (2007), o qual obteve alta especificidade e sensibilidade na detecção de *C. pseudotuberculosis* em cultivo bacteriano oriundo de material caseoso.

2. 3. 9. Resposta imune a *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Neutrófilos e macrófagos são células predominantes logo após a infecção por *C. pseudotuberculosis* (JOLLY, 1965; HARD, 1969). A presença dessas células permite o desenvolvimento dos mecanismos da resposta imune inata, que são importantes nos primeiros dias da infecção, sendo responsáveis em gerar as condições necessárias para o desenvolvimento da resposta adaptativa e direcionar o rumo da infecção (LAN *et al.*, 1999). O predomínio inicial de macrófagos está relacionado a uma rápida resolução da infecção, enquanto que a maior presença de polimorfonucleares levaria, numa etapa seguinte, a uma infecção crônica (JOLLY, 1965).

Os lipídios de superfície celular de *C. pseudotuberculosis*, após a fagocitose, levam a morte dessas células (HARD, 1972; BATEY, 1986), iniciando assim a formação dos granulomas. A retenção do patógeno na cápsula fibrótica constitui um importante mecanismo de defesa, limitando a disseminação da infecção (BATEY, 1986). Em infecções por *Mycobacterium avium*, estudos demonstraram que moléculas de superfície do patógeno provocam danos nas membranas celulares que impossibilitam o hospedeiro de desenvolver uma resposta eficaz para eliminação do micro-organismo,

estando a estrutura peculiar da parede celular relacionada com virulência e patogenicidade (LANNELLE e DAFÉ, 1991).

Os granulomas, principal manifestação clínica da doença, são formados por várias camadas celulares. Internamente é encontrado um centro necrótico, seguido por uma camada rica em macrófagos, uma zona com predominância de linfócitos T e uma zona rica em linfócitos B, limitada externamente por uma cápsula fibrótica (PÉPIN *et al.*, 1994). A sinalização para a formação desse abscesso ainda não é conhecida, mas como as quimiocinas recrutam células de defesa do hospedeiro e estão envolvidas na formação e manutenção do granuloma na tuberculose (BEHAN *et al.*, 2011), acredita-se também estarem envolvidas durante a infecção por *C. pseudotuberculosis*, mais especificamente as beta-quimiocinas. Essas quimiocinas inflamatórias são produzidas por vários tipos celulares (células endoteliais, epiteliais e fibroblastos) em resposta a estímulos externos, tais como micro-organismo e citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α e IL-1.

A imunidade adaptativa a *C. pseudotuberculosis* é atribuída a mecanismos celulares e humorais (LAN *et al.*, 1999), mas a resistência a bactérias intracelulares facultativas esta mais relacionada à presença de células T CD4+, principalmente dos clones Th1, pela produção de IFN- γ e TNF- α que aumentam a atividade bactericida do macrófago e estimulam linfócitos TCD8+, os quais podem produzir mais IFN- γ , além de lisar células infectadas.

3. JUSTIFICATIVA

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente causador da LC em caprinos e ovinos. É uma zoonose economicamente importante, que afeta amplamente pequenos ruminantes no mundo, sendo caracterizada pela formação de abscessos nos linfonodos periféricos, e mais raramente nos linfonodos internos e pulmões (HEIN e CARGILL, 1981). No Nordeste brasileiro, a prevalência de linfadenite caseosa nos rebanhos é alta, o que resulta em graves prejuízos econômicos para essa região do país, na qual muito dos pequenos criadores tem a caprinocultura como uma das suas principais atividades produtivas (RIBEIRO *et al.*, 1988).

É indiscutível a importância das quimiocinas na dinâmica da resposta imune contra patógenos intracelulares facultativos, e até o presente momento não existem estudos envolvendo as quimiocinas em infecção com *C. pseudotuberculosis*.

O presente estudo é necessário para melhor elucidar a dinâmica destas moléculas tão importantes na resposta imune, sendo relevante para o melhor entendimento do comportamento e desenvolvimento de estratégias de combate a esta doença de grande importância econômica na caprino-ovinocultura, que é a linfadenite caseosa. Também esperamos determinar se o antígeno capaz de suscitar tal estímulo nos esplenócitos está localizado na própria bactéria, ou entre as moléculas secretadas por esta durante seu crescimento.

4. HIPÓTESE

Tendo em vista que *M. tuberculosis* é um forte indutor de quimiocinas, sabendo que as quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CCL-5 exercem papéis fundamentais na formação do granuloma tuberculoso e que seus componentes de parede celular tem um papel crucial nessa ação; é cabível esperar que na infecção por *C. pseudotuberculosis*, o qual possui uma resposta imunológica semelhante ao agente etiológico da tuberculose, essas quimiocinas, assim como os componentes de parede celular sejam importantes para direcionar a progressão ou não da LC.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Avaliar a indução da produção de quimiocinas por uma cepa com alta e outra com baixa patogenicidade de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e seus preparados antigênicos utilizando modelo murino *in vitro*, traçando a cinética de produção dessas moléculas e evidenciando sua importância durante a infecção com o referido patógeno, além da caracterização de lipídios de parede da bactéria.

5.2. Objetivos específicos

- Verificar a produção das citocinas TNF- α e IL-1 perante o estímulo de esplenócitos murinos com diferentes antígenos de cepas de *C. pseudotuberculosis* com baixa e alta virulência.

- Verificar a produção das quimiocinas CCL-2 (MCP-1), CCL-3 (MIP-1 α), CCL-4 (MIP-1 β) e CCL-5 (RANTES) perante o estímulo de esplenócitos murinos com diferentes antígenos de cepas de *C. pseudotuberculosis* com baixa e alta virulência.

- Determinar se o antígeno capaz de suscitar tal estímulo nos esplenócitos está localizado na própria bactéria, ou entre as moléculas secretadas por esta durante seu crescimento.

- Definir o perfil lipídico das cepas de alta e baixa virulência de *C. pseudotuberculosis*.

6. MANUSCRITO 1**INDUÇÃO DE QUIMIOCINAS POR DUAS CEPAS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis EM MODELO MURINO**

Miriam F. Rebouças^{1*}; Ludmilla S. Sena¹; Bruno L. Bastos²; José T. Raynal¹; Thiago J. Sousa³; Lília F. Moura-Costa¹; Vasco Azevedo³, Roberto Meyer¹; Ricardo W. Portela¹

¹Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

²Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Brazil, 40170-290

³Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, 31270-901

*Autor correspondente: Instituto de Ciências da Saúde - UFBA, Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil 40.110-100. Phone: 55 (71) 3235-9682, E-mail: miriamreboucas@yahoo.com.br

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente etiológico da Linfadenite Caseosa, doença a qual é responsável por perdas econômicas significativas na pecuária. O mais notável sinal clínico nessa infecção é a formação de granulomas, principalmente em pequenos ruminantes. A sinalização responsável pela formação e manutenção desses granulomas é desconhecida. Sabendo que citocinas e quimiocinas direcionam células para sítios e tecidos específicos, é plausível que quimiocinas participem da formação do abscesso. Este trabalho teve como objetivo avaliar a indução da produção de quimiocinas por duas cepas de *C. pseudotuberculosis* em modelo murino. Esplenócitos retirados de camundongos foram estimulados com a bactéria viva e diferentes extratos antigênicos das cepas de *C. pseudotuberculosis* T1, de baixa patogenicidade, e VD57, de alta patogenicidade. Os sobrenadantes dos cultivos de esplenócitos foram retirados com 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo, e as quantificações de IL-1, TNF- α , CCL-2, CCL3, CCL4 e CCL5 foram realizadas por ELISA. A bactéria viável da cepa VD57 demonstrou alta capacidade em estimular as moléculas em estudo quando comparado com a cepa T1, principalmente nos momentos iniciais, o que pode ter impacto na formação do granuloma. O antígeno lisado de T1 foi capaz de estimular a maioria das moléculas, quando comparado com outras frações antigênicas de ambas as cepas. Esses resultados indicam que *C. pseudotuberculosis* é indutora de quimiocinas, e que as cepas testadas diferem no padrão de indução das mesmas.

Palavras chaves: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, citocinas, quimiocinas, granulomas.

INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram positiva, intracelular facultativa e agente etiológico da linfadenite caseosa (LC). Essa doença é uma zoonose ocupacional de ocorrência mundial, infectocontagiosa de caráter crônico, que acomete principalmente pequenos ruminantes. Esses animais apresentam lesões granulomatosas nos linfonodos externos e/ou internos, as quais também podem ocorrer em órgãos como coração, fígado e pulmão. Essas lesões podem trazer perdas econômicas ao setor pecuário devido à depreciação do couro, condenação de vísceras e carcaças, perda de peso e diminuição da produção de leite (FONTAINE e BAIRD, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2011).

A caprinocultura e ovinocultura tem se destacado no agronegócio brasileiro, principalmente na região Nordeste, que tem na Bahia o estado com o maior rebanho de caprinos do País (BRASIL, 2010), constituindo as principais fontes econômicas e nutricionais de muitas famílias (RIBEIRO *et al.*, 1988; MEYER, 2003; DORELLA *et al.*, 2006). A LC é bastante disseminada em regiões com criações de caprinos e ovinos, com prevalência clínica atingindo 30% a 75% dos animais (FARIA *et al.*, 2004; GUIMARÃES *et. a.l.*, 2011). Um estudo sorológico realizado no ano de 2003 em 19 municípios do semiárido baiano demonstrou uma prevalência média de 46,6% (MEYER, 2003).

A inflamação granulomatosa é uma característica histológica marcante de infecções com alguns agentes intracelulares, consequência da estimulação antigênica crônica causada pela persistência bacteriana no fagócito (BEHAM *et al.*, 2011). Na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* já foi verificado que quimiocinas são essenciais na formação e manutenção de granulomas, o qual tem como função isolar fisicamente a bactéria, impedindo sua disseminação no organismo e criar um ambiente que permita uma resposta imune efetiva (ALGOOD *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos referentes às quimiocinas vêm sendo realizados envolvendo *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose humana, o qual pertence ao mesmo grupo filogenético que *C. pseudotuberculosis*, e desencadeia uma resposta imune semelhante ao mesmo. O *M. tuberculosis* é um forte indutor da expressão de quimiocinas, tendo seus componentes de parede celular um papel crucial nesta ação. Citocinas agem de forma coordenada na formação do granuloma e regulam β -quimiocinas (quimiocinas da família CC) como CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CCL-5, as

quais possuem habilidade de recrutar e ativar células T, mastócitos, monócitos, células dendríticas e natural Killer (NK) para o sítio de infecção (HASAN *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2011). Isso indica que essas moléculas são capazes de modular a resposta imune contra essas infecções bacterianas (INTEMANN, 2011; MENDEZ-SAMPEIRO, 2008).

O campo das quimiocinas é relativamente novo, já que essas foram descobertas e vem sendo estudadas há pouco mais de 20 anos. Até o momento não existem estudos que avaliem a produção destas moléculas em infecções com *C. pseudotuberculosis*. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a indução da produção de quimiocinas pela bactéria viva e por diferentes extratos antigênicos produzidos a partir de uma cepa de baixa e outra de alta patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* em modelo murino, com a finalidade de traçar um perfil comportamental destas moléculas e evidenciar sua importância durante a infecção com o referido patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados

Para realização do cultivo de esplenócitos, foram utilizados 20 camundongos da linhagem BALB/c, com idade de quatro a seis semanas, provenientes do Biotério Central do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (FIOCRUZ-BA), e mais 20 animais para realização da curva de sobrevivência ao desafio com as linhagens bacterianas. O projeto de pesquisa que deu origem ao presente manuscrito foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde UFBA (001/2009).

Linhagens bacterianas

Para a produção de antígenos, foram empregadas duas estirpes bacterianas. A linhagem T1 (MOURA-COSTA *et al.*, 2008) foi isolada de um caprino naturalmente infectado da região de Santa Luz - Ba e mantida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) desde o ano de 2000, onde foi realizada a identificação pelo teste “API coryne” (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França), e após sucessivas culturas em meio específico, foi considerada de baixa patogenicidade por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa que outras estirpes. A partir de então, esta linhagem é mantida na coleção do Laboratório de Microbiologia do ICS/UFBA, sendo utilizada em

diversos ensaios laboratoriais, por promover uma infecção mais branda tanto em caprinos e ovinos como em camundongos infectados experimentalmente. A outra estirpe utilizada foi denominada VD57 (MOURA-COSTA *et al.*, 2008), tendo sido identificada da mesma maneira que a cepa T1 e também pertence à coleção do Laboratório de Microbiologia do ICS/UFBA. Essa linhagem possui alta virulência e é proveniente de um caprino naturalmente infectado da região de Juazeiro, Bahia.

Curva de sobrevivência de camundongos Balb/c desafiados com as linhagens bacterianas estudadas

10 camundongos Balb/c foram inoculados 1×10^6 de bactérias da linhagem T1 e outros 10 animais foram inoculados com 1×10^6 de bactérias da linhagem VD57. Todas as injeções foram realizadas por via intraperitoneal. A taxa de sobrevivência dos murinos foi acompanhada durante o período de 30 dias, com inspeção diária das caixas que os continham para anotação de óbitos.

Soluções antigênicas

Antígeno secretado concentrado pelo método de partição de três fases (TPP)

Para a produção das proteínas secretadas de ambas as cepas, quatro litros de cultura de cada uma delas, obtidas de cultivo em meio BHI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) a 37°C por 48 horas, foram utilizados, seguindo-se protocolo para concentração das proteínas secretadas estabelecido por Paule e colaboradores (2004). As amostras foram armazenadas a - 20°C até o uso.

Antígeno somático/lisado

As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio BHI a 37°C por 48 horas. A cultura foi então centrifugada a 3000 x g por 30 minutos a 4°C. A massa das bactérias foi lavada duas vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) e posteriormente foi adicionado PBS (1:5) para ser realizada a sonicação a 60HZ, usando cinco ciclos de 60 segundos cada (Branson Sonifier 450). As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 30 minutos a 4°C e armazenadas a - 20°C.

Obtenção dos esplenócitos murinos

Vinte camundongos foram sacrificados, lavados com álcool 70%, e secos com papel toalha. Em uma capela de fluxo laminar, foram mantidos em decúbito dorsal e seccionados com materiais de dissecação estéreis, para retirada do baço. Os baços foram acondicionados em placa de Petri contendo meio RPMI e mantidos sempre a 4°C. Para extração dos esplenócitos, os órgãos foram homogeneizados com macerador de tecidos e o produto da maceração colocado em tubos para centrifugação a 4°C por 10 minutos a 500 x g. O sobrenadante foi desprezado e a massa foi ressuspensa em 1ml de RPMI. Os esplenócitos foram contados em câmara de Neubauer, e então adicionados a uma concentração de 1×10^6 células/ml em cada poço de uma placa de cultivo de 24 poços, utilizando-se meio RPMI a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂. O volume final de cada poço foi de 1ml.

Estímulos dos esplenócitos:

Os esplenócitos de 10 camundongos foram estimulados como descrito a seguir: somente com tampão Salina Fosfato (PBS), representando o grupo controle; 5 µg/ml mitógeno Pokeweed (PWM) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), representando o grupo controle positivo; com 10^2 , 10^4 e 10^6 unidades formadoras de colônias - CFU, respectivamente, da cepa de baixa patogenicidade T1 de *C. pseudotuberculosis*; com 10^2 , 10^4 e 10^6 CFU, respectivamente, da cepa de alta patogenicidade VD57 de *C. pseudotuberculosis*. Todos os estímulos foram realizados em triplicata, e o sobrenadante foi retirado de cada um destes 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo. Foram retirados esplenócitos de mais 10 camundongos, os quais foram estimulados como a seguir: somente com PBS, representando o grupo controle; 5 µg/ml de mitógeno PWM, representando o grupo controle positivo; com 80 µg/ml de antígeno secretado em meio BHI de cepa T1 de *C. pseudotuberculosis*; com 80 µg/ml antígeno de cepa T1 de *C. pseudotuberculosis* lisada; com 80 µg/ml de antígeno secretado da cepa VD57 de *C. pseudotuberculosis*; com 80 µg/ml de antígeno de cepa VD57 lisada de *C. pseudotuberculosis*. Esses estímulos também foram realizados em triplicata, e cada um deles foi retirado 24, 48 e 72 horas depois do estímulo inicial. As concentrações de antígeno utilizadas seguiram o que foi descrito por Rebouças e colaboradores (2011).

Mensuração de quimiocinas e citocinas da imunidade inata em sobrenadante de cultivo

Os sobrenadantes do cultivo de esplenócitos com os diferentes estímulos foram submetidos à quantificação das citocinas IL-1 e TNF- α , e das quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, através do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) sanduíche, utilizando kits disponíveis comercialmente (ReD Diagnostics).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo método de Kruskal Wallis, para distribuições não paramétricas, para comparações entre o controle negativo e o positivo, bem como do controle negativo com as estimulações de cada concentração do antígeno vivo e de frações antigênicas das cepas de *C. pseudotuberculosis* em diferentes tempos. A análise de correlação entre a indução de citocinas e quimiocinas foi feita pelo método de Spearman, também para distribuições não paramétricas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse estudo foi conduzido para melhor elucidar a dinâmica da produção de quimiocinas e citocinas durante a infecção por *C. pseudotuberculosis*, por esplenócitos de camundongos susceptíveis Balb/c estimulados com diferentes extratos antigênicos dessa bactéria. Foi escolhido esse modelo animal devido às inúmeras vantagens, tais como o fácil manejo, a existência de linhagens isogênicas, além de demonstrar um padrão de resposta à doença que guarda semelhanças ao observado com os caprinos e ovinos (MOURA-COSTA *et al.*, 2008). Duas linhagens bacterianas da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFBA foram utilizadas: T1 com baixa patogenicidade e VD57 com alta patogenicidade. Com a finalidade de demonstrar a patogenicidade de cada estirpe, foi realizada uma curva de sobrevivência com 20 camundongos Balb/c, metade deles inoculados com T1 e a outra parte com VD57, e acompanhado o número de sobreviventes durante 30 dias (Figura 1). Dos animais desafiados com a cepa T1, 90% se mantiveram vivos durante o período estudado, enquanto os sobreviventes referentes à inoculação com VD57 foram 50%, o que comprova a patogenicidade descrita para cada uma delas. A linhagem T1 foi inicialmente considerada atenuada pela diferença estabelecida na infecção ao ser comparada com outras linhagens da bactéria, onde apresentou uma infecção mais branda em modelo murino (VALE, 2005; SILVA,

2010; FRAGA, 2012), como também no modelo caprino (MOURA-COSTA *et al.*, 2008) e ovino (LIMA; 2009).

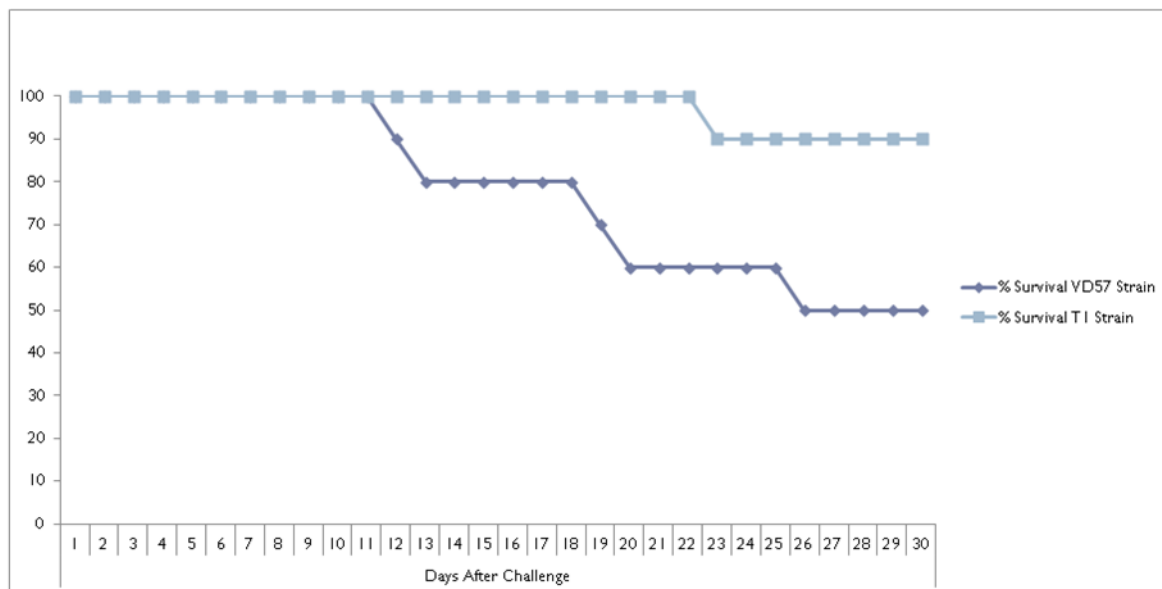


Figura 1. Curva de sobrevivência de camundongos Balb/C após desafio com as cepas VD57 e T1 de *C. pseudotuberculosis*, acompanhados por 30 dias após o desafio. 90% dos animais inoculados com T1 sobreviveram, enquanto 50% dos animais inoculados com VD57 sobreviveram após 30 dias de observação.

Para a estimulação da produção de quimiocinas por esplenócitos murinos, foram utilizadas diferentes concentrações das bactérias vivas em diferentes tempos de cultivo (24, 48 e 72h), assim como distintos extratos antigênicos (secretado e lisado), cultivados também com os mesmos tempos citados para as bactérias vivas. O controle positivo (PWM) de todas as culturas apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (PBS), garantindo o controle de qualidade do cultivo realizado (dados não mostrados). Em alguns momentos, o PBS apresentou leitura na produção de citocinas e quimiocinas, o que já era esperado devido à lise e morte celular durante o tempo transcorrido na metodologia, e esse fato foi considerado para validar a análise final.

As citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 foram escolhidas para inserção neste estudo por estarem descritas na literatura como indutoras de quimiocinas na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, e o fato da ausência de TNF- α resultar em um granuloma com má formação, o que pode prejudicar o controle da infecção tanto na tuberculose como na LC (SADEK *et al.*, 1998; KORBEL *et al.*, 2008; ALGOOD *et al.*, 2011). As quimiocinas são responsáveis por recrutar células de defesa do hospedeiro para os locais de infecção, regulando o tráfego de linfócitos e outros leucócitos através

dos tecidos linfóides periféricos. A expressão de β -quimiocinas, incluindo CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CCL-5 vêm sendo demonstradas em processos crônicos, como psoríases (GILLITZER *et al.*, 1993), inflamação gengival (YU X *et al.*, 1993) e formação do granuloma schistosomal (LUCAKS *et al.*, 1993). Estas quimiocinas exercem papéis fundamentais na formação do granuloma na tuberculose (HAGGE *et al.* 2009; HASAN *et al.*, 2009; MENDEZ-SAMPEIRO, 2008), uma das principais estruturas envolvidas também no combate a linfadenite caseosa. Sendo assim, as moléculas CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CCL-5 foram avaliadas nesse estudo por serem descritas como importantes durante a infecção com a bactéria causadora da tuberculose humana, a qual é amplamente estudada e possui uma resposta imune semelhante com o bacilo causador da LC (HASAN *et al.*, 2009; ALGOOD *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2011). Na Figura 2, pode-se observar a produção das citocinas e quimiocinas estudadas com diferentes concentrações antigênicas de uma cepa de baixa e outra de alta patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* vivas.

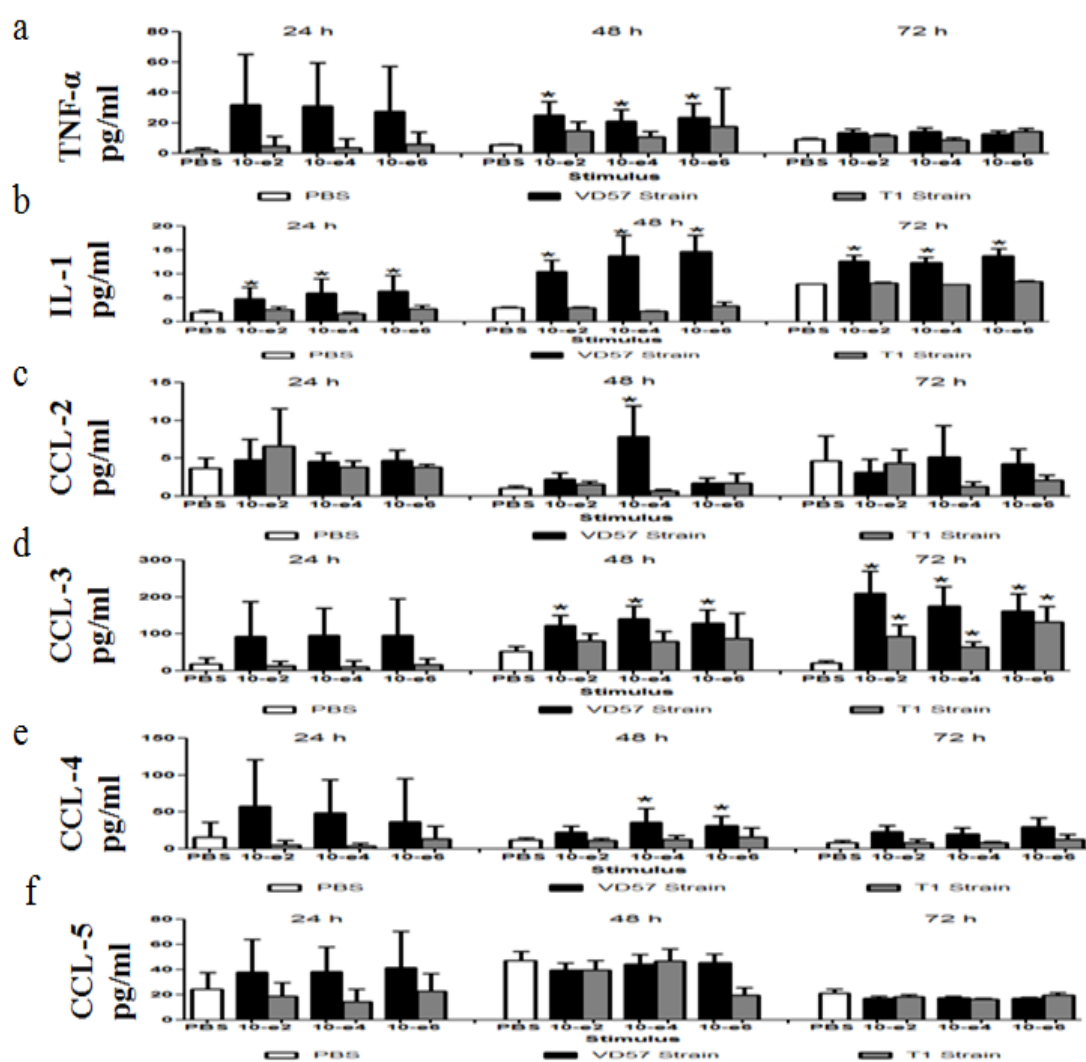


Figura 2. Produção de citocinas por esplenócitos de 10 camundongos estimulados com diferentes concentrações de duas cepas de *C. pseudotuberculosis* em tempos distintos. * Diferença estatística significativa entre o controle negativo (PBS) e o estímulo em cada tempo. ($p \leq 0,05$).

Houve produção significativa de TNF- α quando os esplenócitos foram estimulados com a cepa VD57 no tempo de 48 horas após o cultivo, em todas as concentrações de bactérias vivas. Não houve produção significativa de TNF- α quando as células foram estimuladas por T1 viva. No tempo de 24 horas, houve uma grande variação nos níveis de TNF- α produzidos pelos esplenócitos após estímulo com VD57, o que levou a um grande desvio padrão (Figura 2a). Essa variação já foi descrita na literatura para outras citocinas, em modelos murinos, ovinos e caprinos (El-ENBAAWY *et al.*, 2005; MOURA-COSTA *et al.*, 2008; REBOUÇAS *et al.*, 2011), o mesmo aconteceu com outras moléculas estudadas em diferentes tempos de cultivo.

A metodologia utilizada para avaliar a indução de TNF- α também foi realizada para avaliar a produção de IL-1 e das quimiocinas estudadas. Os resultados da produção de IL-1 podem ser vistos na Figura 2b; houve indução significativa, embora em níveis inferiores ao alcançado por TNF- α , quando os esplenócitos foram estimulados por VD57 viva, em todos os tempos e concentrações, o mesmo não ocorrendo quando o estímulo foi feito com a cepa T1.

Na Figura 2c, encontram-se os resultados da produção de CCL-2 pelas células do baço dos camundongos com a bactéria viva das duas linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Houve produção significativa de CCL-2 quando as células foram estimuladas com 10^4 CFU de VD57 somente no tempo de 48 horas e, apesar de TNF- α e de IL-1 também serem produzidas nesse momento, não foi verificada correlação entre a produção dessas moléculas com CCL-2 (tabela 1). A bactéria viva T1, da mesma maneira que ocorreu com as citocinas descritas, não apresentou produção significativa de CCL-2 em nenhum dos estímulos. É bem documentado que CCL2 é potente ativador de monócitos, atraindo linfócitos T CD4⁺ e células dendríticas, e exerce papel fundamental no controle da tuberculose em ratos (BEHAN *et al.*, 2011; INTEMANN *et al.*, 2011), embora altos níveis dessa molécula em humanos possa ocasionar aumento de susceptibilidade à tuberculose, talvez por insensibilização do seu receptor (INTEMANN *et al.*, 2011).

Especificamente, CCL-3, CCL-4 e CCL-5 na infecção por *M. tuberculosis* induzem ativação e proliferação de células T e de macrófagos. CCL-3 promove ainda a diferenciação de células Th1 (ARIAS *et al.*, 2007). No presente estudo, VD57 estimulou a produção significativa de CCL-3 48 e 72 horas após o estímulo, em todas as

concentrações da bactéria viva e T1 estimulou produção de CCL-3 de forma mais tardia, somente 72 horas após estímulo (Figura 2d). Essa quimiocina foi a única com produção significativa referente à cepa de baixa patogenicidade. A indução significativa de CCL-3 pela cepa de baixa patogenicidade esta relacionada positivamente com a indução de TNF- α e IL-1, mesmo não ocorrendo indução significativa dessas citocinas por essa cepa (Tabela 1). A produção referente à quimiocina CCL-3 foi a maior de todas as moléculas estudadas para ambas as cepas de *C. pseudotuberculosis*. Então, sugere-se que o sistema imune necessita da quimiocina CCL-3 para montar a sua resposta frente à infecção com *C. pseudotuberculosis* e que a resposta à cepa patogênica é mais precoce quando comparada a menos patogênica.

A quimiocina CCL-4 foi produzida de forma significativa por esplenócitos estimulados com a bactéria VD57 viva após 48 horas nas concentrações de 10^4 a 10^6 CFU e essa produção teve correlação positiva com a produção de TNF- α . A bactéria T1 viável não induziu produção de CCL-4 (Figura 2e). Assim como percebido em relação a CCL2, CCL4 também é induzida pela cepa patogênica viável e não pela pouco patogênica, se mostrando importante para sinalização inicial que provavelmente resultará na formação do granuloma, principal sintoma clínico da infecção crônica gerada pelo bacilo causador da linfadenite caseosa.

Já em relação a CCL-5 não houve produção significativa pelos esplenócitos em nenhuma concentração da bactéria viável de ambas as linhagens (Figura 2f), ou seja, a única molécula não estimulada pela cepa de alta patogenicidade. Esse padrão de resposta da cepa VD57 provavelmente está associado a um mecanismo de escape do micro-organismo patogênico para continuar a multiplicação pelo organismo, visto que a importância da quimiocina CCL-5 foi evidenciada no controle da tuberculose murina, onde a resposta imune adquirida e a formação do granuloma foi fraca na sua ausência (VESOSKY *et al.*, 2010). Portanto, a ausência de indução de CCL-5 pela cepa VD57 patogênica pode resultar na má formação do abscesso caseoso e a não retenção dessa bactéria dentro do granuloma. A linhagem T1 viva, por não ser uma potente indutora de sintomatologia e, portanto, pouco indutora de granuloma, parece necessitar somente da produção de CCL-3, um potente ativador de resposta Th1, e induzir certa resistência verificada em seus hospedeiros, sendo CCL-5 mais uma das quimiocinas sem produção significativa. Já a cepa VD57 foi capaz de estimular todas as moléculas estudadas até o momento, mas falhou em estimular a produção de CCL-5, o que pode estar associada

com a sua alta patogenicidade, induzindo um granuloma desestruturado que permita o escape da bactéria para continuar a se disseminar pelo organismo do hospedeiro. Há também de se levar em consideração que uma indução significativa de citocinas da imunidade inata, pode, quando em altas concentrações, levar a um quadro de choque séptico e morte do animal.

Com intuito de estabelecer se a indução de cada citocina se relaciona com os níveis obtidos para cada quimiocina estudada na infecção por *C. pseudotuberculosis* utilizando como estímulo a bactéria viva e suas frações em esplenócitos murinos, foram realizadas análise de correlação de Spearman (Tabela 1). Só foram levados em consideração para análise de correlação os dados quando houve produção significativa de cada molécula comparada ao controle negativo. Pode se notar que, no geral, as citocinas pesquisadas obtiveram correlação com a indução das quimiocinas na infecção por *C. pseudotuberculosis* e, nos casos que não houve essa correlação, outro fator que pode ter estimulado a indução das quimiocinas seria o próprio micro-organismo, através de sua capacidade de adesão celular e invasividade. As quimiocinas inflamatórias pesquisadas são produzidas por leucócitos e vários tipos celulares (células epiteliais, endoteliais e fibroblastos) em resposta a estímulos externos, incluindo citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1 (MATSUSHIMA *et al.*, 1988; OPPENHEIM *et al.*, 1991), induzidos por constituintes de micro-organismos, como moléculas da parede celular (CHATTERJEE *et al.*, 1992). É conhecido que a indução de citocinas inflamatórias por macrófagos alveolares na tuberculose estimula a expressão de quimiocinas de uma forma autócrina (TAUB *et al.*, 1995; WALLIS *et al.*, 1986). Brieland e colaboradores (1995) verificaram que TNF- α e IL-1 estimulam a produção de CCL-2 em macrófagos alveolares murinos, embora Streiter e colaboradores (1990) não tenham observado o mesmo em macrófagos alveolares humanos. As diferenças encontradas talvez aconteçam por causa de diferentes condições de cultivo, sendo possível que a expressão de citocinas inflamatórias em infecções por *M. tuberculosis* (SADEK *et al.*, 1998) e por *C. pseudotuberculosis* contribuam para o aumento dos níveis de quimiocinas.

Tabela 1. Correlação entre citocinas e quimiocinas produzidas de forma significativa pelas cepas vivas de *C. pseudotuberculosis* e frações antigênicas, detectadas pelo método estatístico de Spearman. Os traços indicam situações nas quais não foi observada produção significativa de quimiocinas.

Cepa VD57 viva				
Citocinas/Quimiocinas	CCL-2	CCL-3	CCL-4	CCL-5
TNF- α	ausente	positiva	positiva	---
IL-1	ausente	positiva	ausente	---
Cepa T1 viva				
Citocinas/Quimiocinas	CCL-2	CCL-3	CCL-4	CCL-5
TNF- α	---	positiva	---	---
IL-1	---	positiva	---	---
Lisado de T1				
Citocinas/Quimiocinas	CCL-2	CCL-3	CCL-4	CCL-5
TNF- α	ausente	positiva	positiva	positiva
IL-1	positiva	positiva	ausente	positiva
Secretado de VD57				
Citocinas/Quimiocinas	CCL-2	CCL-3	CCL-4	CCL-5
TNF- α	---	positiva	---	positiva
IL-1	---	ausente	---	ausente

As distintas concentrações bacterianas utilizadas para estimular as células murinas não mostraram diferenças marcantes na indução das moléculas, mas podemos afirmar que a quantidade de 10^4 células bacterianas é a ideal para uso posterior nas mesmas condições de cultivo, por mostrar capacidade de indução quando somente uma das outras concentrações ou quando ambas (10^2 e 10^6) estimularam a produção das citocinas e quimiocinas de maneira significativa.

Os resultados mostram que *C. pseudotuberculosis* é capaz de induzir quimiocinas e, assim como em estudo com bacilo da tuberculose descrito anteriormente (RHOADES *et al.*, 1995), nota-se que a produção de quimiocinas pode variar de acordo com as cepas estudadas. Segundo Saukkonem e colaboradores (2002), uma cepa virulenta de *M. tuberculosis* foi capaz de induzir macrófagos alveolares humanos a produzirem CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CCL-5, resultado também encontrado por outros pesquisadores (SADEK *et al.*, 1998) e uma cepa avirulenta foi capaz de induzir as mesmas quimiocinas, com destaque maior para CCL-3. Nesse estudo, Sadek, utilizando

distintas cepas de *C. pseudotuberculosis*, no geral, a bactéria VD57 (patogênica) estimulou mais TNF- α , IL-1, CCL-2, CCL-3 e CCL-4 quando comparada a T1. A VD57 só não foi capaz de estimular a produção de CCL-5, enquanto a linhagem de baixa patogenicidade T1 só estimulou produção de CCL-3 após 72 horas, indicando que a cepa de alta virulência apresentou uma resposta mais rápida, o que pode ter impacto na formação do granuloma (SAUKKONEM *et al.*, 2002; VESOSKY *et al.*, 2010). O resultado, apesar de indicar diferenças cepa-específica já descritas na literatura, não foi semelhante ao encontrado em estudo de *M. tuberculosis* envolvendo cepas virulenta e avirulenta, provavelmente pelas diferenças nas metodologias e nos mecanismos de escape do sistema imune.

Além de estimular as células do baço de camundongos com a bactéria viva, também foram utilizados extratos antigênicos (lisado e secretado) das duas cepas bacterianas estudadas de alta e baixa patogenicidade, para verificar a produção de TNF- α , IL-1, CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CCL-5. Os resultados podem ser visualizados na Figura 3. A bactéria em alguns momentos induziu taxas maiores de produção das moléculas estudadas do que algumas de suas frações, provavelmente devido à interação do patógeno vivo com células hospedeiras, desempenhando funções de reconhecimento, adesão, invasão, sobrevivência nos esplenócitos e taxa de crescimento.

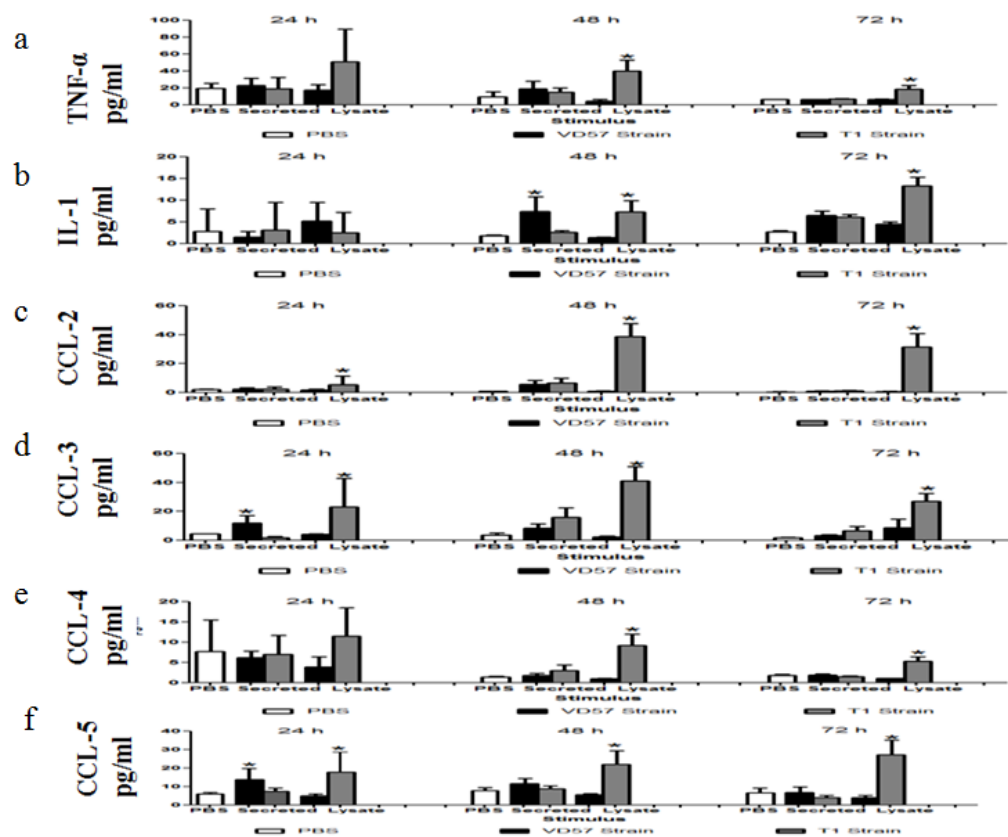


Figura 3. Produção de citocinas por esplenócitos de 10 camundongos estimulados com 80 μ g de antígeno lisado ou secretado das cepas T1 e VD57 de *C. pseudotuberculosis*, em tempos distintos. * Diferença estatística significativa entre o controle positivo e o estímulo, em cada determinado tempo ($p \leq 0,05$).

Pode-se observar, na Figura 3a, a produção significativa de TNF- α quando os esplenócitos foram estimulados com antígeno lisado da bactéria T1, nos tempos 48 e 72 horas. O antígeno secretado de T1 e as frações antigênicas de VD57 não induziram produção significativa de TNF- α . Houve produção significativa de IL-1 no cultivo das células do baço nos tempos 48 e 72 horas com a indução com antígeno lisado da bactéria T1, assim como TNF- α , embora em menores níveis e também quando foram estimulados com o antígeno secretado da cepa VD57 no tempo de 48 horas (Figura 3b).

Em relação a CCL-2, utilizando o antígeno lisado da cepa T1, também houve produção significativa esplenócitos murinos em 24, 48 e 72 horas após o estímulo com correlação positiva à produção de TNF- α (Tabela 1) e não houve produção significativa com o antígeno secretado de ambas as cepas e nem com lisado de VD57 (Figura 3c). O antígeno lisado de T1 obteve produção significativa de CCL-3 na estimulação dos esplenócitos nos tempos de 24, 48 e 72 horas e com correlação positiva em relação à produção das citocinas (Tabela 1). Também houve produção significativa de CCL-3 quando a estimulação foi realizada com antígeno secretado da cepa VD57 24 horas após o estímulo (Figura 3d), essa produção só teve correlação positiva com a indução da citocina TNF- α (Tabela 1).

Houve produção significativa de CCL-4 apenas quando os esplenócitos foram estimulados com o antígeno lisado da cepa T1, 48 e 72 horas após o estímulo (Figura 3e), com níveis de indução correlacionados com os de TNF- α (Tabela 1). Na Figura 3f, verificamos que CCL-5 foi produzido significativamente quando os esplenócitos foram estimulados com o antígeno lisado da cepa T1, 24, 48 e 72 horas após o estímulo com correlações com os níveis das citocinas, e ocorreu também produção significativa de CCL-5 24 horas após o estímulo por antígeno secretado da cepa VD57, correlacionada com a indução de TNF- α (Tabela 1).

Analisando esses resultados referentes à estimulação de células do baço de camundongos Balb/c com frações antigênicas de cepa com alta e baixa patogenicidade, percebemos que o antígeno lisado oriundo da cepa T1 obteve maior estimulação de quimiocinas e citocinas quando comparado aos outros antígenos utilizados nesse estudo, principalmente no tempo de 72 horas. Em trabalhos anteriores com camundongos também Balb/c, já tinha sido descrito uma melhor estimulação de citocinas pelo lisado de T1 em relação ao secretado da mesma cepa (VALE, 2005). As taxas altas de indução

das moléculas estudadas pelo lisado de T1 provavelmente estão associadas à concentração do antígeno indutor da imunidade inata, com exposição de moléculas não expostas naturalmente, ou mesmo que estão encobertos por outros antígenos de membrana. VD 57, em alguns momentos, induziu de forma significativa CCL-5 e CCL-3 (24h), e IL-1 (48h), utilizando o antígeno secretado. O antígeno lisado de VD57 e o antígeno secretado de T1 não foram capazes de induzir de forma significativa as citocinas e quimiocinas estudadas. Portanto, assim como verificado em estudos anteriores, a contribuição das quimiocinas pode variar significativamente de acordo com a virulência do organismo e seus mecanismos de escape (CHENSUE, 2001; HAGGE *et al.*, 2009).

Propriedades relacionadas a fatores de virulência, como composição da parede celular, podem ser responsáveis por diferenças na resposta imune e provavelmente na formação do granuloma (MARQUES DA SILVA *et al.*, 2010). As altas taxas de produção de quimiocinas frente ao antígeno lisado de cepa T1 reforçam a ideia de que as diferenças observadas em modelo murino perante os distintos extratos antigênicos podem estar associados à composição da parede celular de cada linhagem bacteriana e que essa fração antigênica da cepa de baixa patogenicidade é um candidato promissor para uso em imunodiagnóstico e imunoprevenção da LC. Entender os fatores que contribuem para esse complexo relacionamento entre o patógeno e o hospedeiro é essencial para modular com sucesso os ensaios clínicos.

Montando um quadro com todos os resultados obtidos, podemos notar que, dependendo da cepa e do extrato antigênico de *C. pseudotuberculosis* utilizados em modelo murino, pode haver produção das citocinas TNF- α e IL-1 e das quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CCL-5, e com isso permitir uma ação de quimiotaxia, principalmente de leucócitos e macrófagos importantes na formação do abscesso, assim como na infecção por *M. tuberculosis*. Vale a pena ressaltar que a cepa viva capaz de causar doença só não induziu CCL-5, responsável pela formação e manutenção de um granuloma que consegue isolar a bactéria do organismo, sendo provavelmente um fator contribuinte para sua patogenicidade. Também como verificado na tuberculose, diferenças na produção dessas moléculas podem ter impacto na resposta imune inata e adquirida da LC (VESOSKY *et al.*, 2010).

CONCLUSÕES

Frente ao protocolo experimental desenvolvido e aos resultados obtidos, conclui-se que:

- *C. pseudotuberculosis* é capaz de induzir a produção das quimiocinas estudadas.
- A cepa de alta patogenicidade viva estimula mais as quimiocinas quando comparada com a de baixa virulência viva, o que pode ter impacto na formação da principal sintomatologia clínica da LC, o granuloma.
- O antígeno lisado de T1 foi o extrato antigênico que mostrou maior capacidade de indução das quimiocinas, seguido pelo secretado de VD57. O secretado de T1 e o lisado de VD57 não foram capazes de induzir as moléculas estudadas em nenhum momento de forma significativa.
- Com a maior capacidade de indução de quimiocinas, o lisado de T1 constitui um candidato promissor para melhor purificação e posterior utilização para desenvolvimento em teste de imunodiagnóstico e imunoprofilaxia.
- Cepas bacterianas diferentes resultam em distintos padrões de indução dessas moléculas o que pode influenciar na sua patogenicidade e capacidade de formação e manutenção do granuloma.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BHI – meio de infusão de cérebro e coração
CFU – unidade formadora de colônias
ELISA – ensaio de imunoadsorção enzimática
h - hora
Hz – hertz
ICS – Instituto de Ciências da Saúde
LC – linfadenite caseosa
µg – micograma
PBS – salina tamponada com fosfato
PWM – pokeweed
TPP – partição por três fases
UFBA – Universidade Federal da Bahia
X g – força gravitacional

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram que não há interesses conflitantes.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

MFR realizou os experimentos de produção antigênica, estimulação de esplenócitos, e redigiu o manuscrito. LSS participou na realização de cultivos e ensaios imunoenzimáticos. JTR e TJS realizaram o estudo de sobrevivência dos camundongos inoculados com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis*. BLB participou da concepção do estudo e da análise estatística. LFMC cultivou as linhagens bacterianas estudadas e participou na produção dos extratos antigênicos. VA, RM e RWP conceberam o estudo, participaram na coordenação do projeto e ajudaram a redigir o manuscrito.

INFORMAÇÕES DOS AUTORES

MR é médica veterinária, mestre em Imunologia e doutoranda da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio). LSS é médica veterinária e mestre em Ciência Animal. JTR é médico veterinário, mestre em Ciência Animal e doutorando da Renorbio. BLB é médico veterinário, mestre em Ciência Animal e doutor em Imunologia. LMC é médica, mestre e doutora em Imunologia, e Professora Adjunta de Microbiologia do ICS/UFBA. VA é médico veterinário, mestre e doutor em Genética de Micro-organismos, e Professor Titular de Genética do ICB/UFMG. RM é médico, mestre e doutor em Imunologia, e Professor Titular de Imunologia do ICS/UFBA. RW é médico veterinário, mestre em Medicina Veterinária Preventiva, doutor em Bioquímica e Imunologia, e Professor Adjunto de Imunologia do ICS/UFBA.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (Labimuno-ICS/UFBA) local de realização do experimento por prestatividade e

atenção, principalmente a Francisca Soares, Marcus Silva e Andreia Pacheco. Este estudo foi apoiado pela FAPESB e FAPEX.

REFERÊNCIAS

ALGOOD, H. M. S.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine e Growth Factor Reviews**, v. 14, p.467-477, 2003.

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

ARIAS, M. A. ; JARAMILLO, G. ; LOPEZ, Y.P. ; MEJIA, N. ; MEJIA, C. ; *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* antigens specifically modulate CCR2 and MCP-1/CCL2 on lymphoid cells from human pulmonary hilar lymph nodes. **J Immunol** 179: 8381–8391, 2007.

BEHAM, A. W.; PUELLMANN, K.; LAIRD, R.; FUCHS, T.; STREICH, R.; BREYSACH, C.; RADDATZ, D.; ONIGA, S.; PECCERELLA, T.; FINDEISEN, P.; KZHYSKOWSKA, J.; GRATCHEV, A.; SCHEYER, S.; SAUNDERS, B.; WESSELS, J. T.; MOBIUS, W.; KEANE, J.; BECKER, H.; GANSER, A.; NEUMAIER, M.; KAMINSKI, W. E. A TNF-Regulated Recombinatorial Macrophage Immune Receptor Implicated in Granuloma Formation in Tuberculosis. **PLoS Pathogens**, November, Vol. 7, Issue 11, e1002375, 2011.

BRASIL. 2010. Ministério do planejamento, orçamento e gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, v.38, 2010.

BRIELAND, J. K.; FLORY, C. M.; JONES, M. L.; MILLER, G. R.; REMICK, D. G.; WARREN, J. S.; FANTONE, J. C. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 12:104–109, 1995.

CHATTERJEE, D.; ROBERTS, A. D.; LOWELL, K.; BRENNAN, P.J.; ORME, I. M. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. **Infect. Immun.** 60:1249–1253, 1992.

CHENSUE, S. W. Molecular machinations: chemokines signals in host-patogen interactions. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 14, n. 4, p. 821 – 835, 2001.

DEVERGNE, O.; MARFAING-KOKA, A.; SCHALL, T.J.; *et al.* Production of the involvement of macrophages and endothelial cells. **J Exp Med**; 179:1689-94, 1994.

DORELLA, F. A.; ESTEVAM, E. M.; PACHECO, L. G.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G.; BARSANTE, M. M.; OLIVEIRA, S. C. ; MEYER, R. ; MIOSHY, A.; AZEVEDO, V. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium*

pseudotuberculosis: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7368-7372, 2006.

EL-ENBAAWY, M. I.; SAAD, M. M.; SELIM, S. A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Egypt.**, v. 12, p. 13-20, 2005.

FARIA, G. A.; MORAIS, O. R.; GUIMARAES, P. H. S. Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. **Relatório técnico**. 2004. Disponível em: <www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovino-caprino-cultura.pdf>.

FONTAINE, M.C., BAIRD, G. CONNOR, K.M., RUDGEA, K., SALES, J., DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, p. 5986–5996, 2006.

FRAGA, R. Aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com linhagem selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos. **Tese de Doutorado em Imunologia**. Universidade Federal da Bahia, Brasil, Salvador. p. 161, 2012.

GILLITZER, R.; WOLFF, K.; TONG, D.; *et al.* MCP-I mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. **J Invest Dermatol**. 101:127-31, 1993.

GUIMARAES, A. S.; CARMO, F. B.; HEINEMANN, M. B.; PORTELA, R. W. D.; 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**, v. 7, n. 68, 19 p, 2011.

HAGGE D. A. *et al.* Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 174, n.4, p. 1379 – 1389, 2009.

HASAN, Z.; JAMIL, B.; KHAN, J.; ALI, R.; KHAN, M. A.; NASIR, N.; YUSUF, M. S.; JAMIL, S.; IRFAN, M.; HUSSAIN, R. Relationship between circulating levels of IFN-gamma, IL-10, CXCL9 and CCL2 in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis is dependent on disease severity. **Scandinavian journal of immunology**, n. 69, v. 3, p. 259-67, 2009.

INTEMANN, C. D.; THYEL, T.; FORSTER, B.; OWUSU-DABO, E.; GYAPONG, J.; HORSTMANN, R. D.; MEYER, C. G. MCP1 haplotypes associated with protection from pulmonary tuberculosis. **BMC Genetics**, 12:34, 2011.

KANG, D. D.; LIN, Y.; MORENO, J. R.; RANDALL, T. D.; KHADER, S. A.. Profiling Early Lung Immune Responses in the Mouse Model of Tuberculosis. **PLoS one**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2011.

KORBEL, D. S.; SCHNEIDER, B. E.; SCHAIBLE, U. E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes and Infection** 10, p. 995-1004, 2008..

LANNELLE, G.; DAFPE, M. Mycobacterial cell wall and pathogenicity. **Res. Microbiol.** v. 142, p. 167-261, 1991.

LIMA, D. D. Estudo da resposta imune induzida por uma linhagem atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos criados em sistema extensivo. **Dissertação de Mestrado em Imunologia**, Universidade Federal da Bahia, 2009..

LUKACS, N. W.; KUNKEL, S. L.; STRIETER, R. M.; WARMINGTON, K.; CHENSUE S. W. The role of macrophage inflammatory protein 1a in *Schistosoma mansoni* egg- induced granulomatous inflammation. **J Exp Med**; 177:1551-9, 1993.

MARQUES DA SILVA, T. R.; PETERSEN, A. L. O. A.; SANTOS, T. A.; ALMEIDA, T. F.; FREITAS, L. A.R.; VERAS, P. S. T. Control of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium intracellulare* infections with respect to distinct granuloma formations in livers of BALB/c mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, agosto, 105(5), p.642-648, 2010.

MATSUSHIMA, K.; MORISHITA, K.; YOSHIMURA, T.; LAVU, S.; KOBAYASHI, Y.; LEW, W.; APPELLA, E.; KUNG, H. F.; LEONARD, E. J.; OPPENHEIM, J. J. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.** 167:1883–1893, 1988.

MENDEZ-SAMPEIRO, P. Expression and regulation of chemokines in mycobacterial infection. *J. Infec.*, **London**, v.57, n. 5, p. 374 -378, 2008.

MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* e seu hospedeiro caprino: Aspectos da Prevalência, do Diagnóstico e da Vacinação. **Tese de Doutorado em Imunologia**. Universidade Federal da Bahia, Brasil, Salvador. p. 83, 2003.

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

MOURA-COSTA , L.F.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; VALE, V.L.C.; PAULE, B.J.A.; PORELA, R.W.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L.M.S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde´ goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, (126): 131–141, 2008.

OPPENHEIM, J. J.; ZACHARIAE, C. O.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. **Annu. Rev. Immunol.** 9:617–648, 1991.

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*. **Prot. Express. Purif.** 34, 311–316, 2004.

REBOUÇAS, M. F.; PORTELA, R. W. D.; LIMA, D. D.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; VALE, V.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **J Vet Diagn Invest**, 23:213–220, 2011.

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J. A. H.; MAIA, P. C. C.; CAMPOS, W. G. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 8, n. 1/2, p. 27-29, 1988.

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J. A. H.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; FERNANDES, G. B. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesq Agropec Bras**, 26: 461-465, 1991.

RHOADES, E. R. ; COOPER, A.M. ; ORME, I. M. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** 63:3871–3877, 1995.

SADEK, M. I.; SADA, E.; TOOSSI, Z.; SCHWANDER, S. K.; RICH, E. A. Chemokines Induced by Infection of Mononuclear Phagocytes with *Mycobacteria* and Present in Lung Alveoli during Active Pulmonary Tuberculosis. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, vol. 19, pp. 513–521, 1998.

SAUKKONEN, J. J.; BAZYDLO, B.; THOMAS, M.; STRIETER, R. M.; JOSEPH KEANE, J.; KORNFELD, H. β -Chemokines Are Induced by *Mycobacterium tuberculosis* and Inhibit Its Growth. **Infection and Immunity**, p. 1684–1693, 2002.

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

STRIETER, R. M.; CHENSUE, S. W.; BASHA, M. A.; STANDIFORD, T. J.; J. P. LYNCH, J. P.; BAGGIOLINI, M.; KUNKEL, S. L. Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor- α , lipopolysaccharide, and interleukin-1 β . **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 2:321–326, 1990.

TAUB, D. D. P.; PROOST, W. J.; MURPHY, M.; ANVER, D. L.; LONGO, J.; VAN DAMME, J.; OPPENHEIM, J. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3, are chemotactic for human T lymphocytes. **J. Clin. Invest.** 3:1370–1376, 1995.

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

VESOSKY, B.; ROTTINGHAUS, E. K.; STROMBERG, P.; TURNER, J.; BEAMER, G. CCL5 participates in early protection against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 6, p. 1153-65, 2010.

WALLIS, R. S.; FUJIWARA, H.; ELLNER, J. J. Direct stimulation of monocyte release of interleukin-1 by mycobacterial protein antigens. **J.Immunol.** 136:193–196, 1986..

YU, X.; ANTONIADES, H. N.; GRAVES, D. T. Expression of monocyte chemoattractant protein I in human inflamed gingival tissues. **Infect Immun**;61:4622-8, 1993.

7. MANUSCRITO 2

LIPÍDIOS DE PAREDE CELULAR DE CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* COM DIFERENTES PATOGENICIDADES DIFEREM EM COMPOSIÇÃO E RECONHECIMENTO IMUNOLÓGICO

Miriam F. Rebouças^{1*}; Bruno L. Bastos², José T. Raynal¹, Danielle D. Lima¹, Lília F. Moura-Costa¹, Vasco Azevedo³, Roberto Meyer¹, Ricardo W. Portela¹

¹Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 40110-100

²Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Brazil, 40170-290

³Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, 31270-901

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

RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* principalmente em pequenos ruminantes, sendo caracterizada pela formação de granulomas nos linfonodos e/ou vísceras. Apesar de não se conhecer muito sobre a interação patógeno/hospedeiro desta bactéria, é conhecido que a sua composição lipídica é importante para sua caracterização taxonômica e patogenicidade. Nesse estudo, lipídios de parede de cepas de *C. pseudotuberculosis* com baixa e alta patogenicidade foram isolados e purificados. As cepas foram cultivadas, e foram realizadas extrações com solventes orgânicos na massa bacteriana. As frações geradas de ambas as cepas foram submetidas a uma cromatografia de interação hidrofóbica. Após análise em SDS-PAGE, foram observadas diferenças entre o perfil de moléculas extraídas das diferentes cepas. Antígenos de 11 kDa das cepas foram reconhecidos por anticorpos IgM, sendo que a cepa de baixa patogenicidade reagiu mais intensamente no *imunoblot*. Avaliando o perfil lipídico de cada cepa estudada por espectrometria de massas, podemos concluir que a linhagem de alta patogenicidade difere da de baixa patogenicidade por apresentar maiores quantidades de ácidos graxos insaturados e glicerofosfoinositois, fato que pode contribuir para sua capacidade em causar a doença nos animais suscetíveis.

Palavras chaves: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, linfadenite caseosa, lipídios.

INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura é uma atividade rural de grande importância para o Brasil, principalmente para os pequenos e médios produtores da região Nordeste, pois os rebanhos de pequenos ruminantes constituem a principal fonte econômica e nutricional dessa população (MEYER, 2003; DORELLA *et al.*, 2006). Entre as doenças que acometem os rebanhos caprinos e ovinos nesta e em outras regiões brasileiras, está a linfadenite caseosa, doença crônica infecciosa cujo agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacilo pleiomorfo Gram positivo e patógeno intracelular facultativo de fagócitos (DORELLA, 2006). As manifestações dessa doença nos pequenos ruminantes são caracterizadas principalmente por necrose caseosa dos linfonodos. Por ser uma bactéria intracelular facultativa, a resposta imune celular se constitui uma importante arma do hospedeiro para combater a infecção (MEYER *et al.*, 2006).

Estudos recentes realizados com *M. tuberculosis* demonstraram que antígenos não proteicos apresentam um grande potencial para o desenvolvimento de vacinas e testes de imunodiagnóstico (HAMASUR *et al.*, 2003; MISHRA *et al.*, 2007; MISHIRA *et al.*, 2008). Os lipídios são os principais constituintes da superfície celular bacteriana e foram descritos como importantes fatores para a patogênese da infecção por *C. pseudotuberculosis* (HARD, 1972). De modo geral, a associação das moléculas lipídicas na parede bacteriana resulta em uma barreira altamente impermeável característica do gênero *Corynebacterium*, havendo uma relação entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de granulomas crônicos (MUCKLE e GYLES, 1982).

Entre os principais e mais abundantes fatores de virulência da parede celular, estão as âncoras de fosfatidil-myo-inositol associadas à manose (PIMs) e os lipoglicanos presentes nas bactérias da família *Corynebacterineae*, envolvendo as moléculas de lipomanose (LM) e lipoarabinomanose (LAM) (MISHRA *et al.*, 2008); essas moléculas são fortes indutoras de citocinas imunoestimulatórias (VERCELLONE *et al.*, 1998). Já foi observado que lipídios extraídos de cepas diferentes de *M. tuberculosis* apresentam estimulação de padrões distintos de respostas imunes (MOHAN *et al.*, 2008).

Embora as pesquisas relacionadas às moléculas de superfície ainda estejam desvendando relações patógeno/hospedeiro, estudos realizados com protozoários

indicam que estes compostos apresentam grande potencial para a elaboração de testes de imunodiagnóstico, visto que são antígenos reconhecidos pelo sistema imune desde a fase aguda das infecções (GIRALDO *et al.*, 2000). Diante dos potenciais biotecnológicos dos lipídios apresentados pela literatura, este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de moléculas estruturais hidrofóbicas de *C. pseudotuberculosis* de cepas de baixa e alta virulência, de forma a identificar e caracterizar os antígenos com potencial aplicabilidade em testes de imunodiagnóstico e imunoprofilaxia.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens bacterianas

Para o estudo comparativo dos antígenos não proteicos de cepas de *C. pseudotuberculosis* foram empregadas duas estirpes bacterianas. A linhagem T1 (MOURA-COSTA *et al.*, 2008) foi isolada de um caprino naturalmente infectado da região de Santa Luz e mantido no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) desde o ano de 2000, onde foi realizada a identificação pelo teste “API coryne” (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França), e foi considerada de baixa patogenicidade por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa do que outras estirpes. A partir de então, esta linhagem é mantida, na coleção do Laboratório de Microbiologia do ICS/UFBA, sendo utilizada em diversos ensaios laboratoriais por promover uma infecção mais branda tanto em caprinos e ovinos como em camundongos infectados experimentalmente. A outra estirpe utilizada é denominada VD57 (MOURA-COSTA *et al.*, 2008), foi identificada da mesma maneira que a T1 e também pertence à coleção do Laboratório de Microbiologia do ICS/UFBA. Essa linhagem possui alta virulência e foi proveniente de um caprino naturalmente infectado da região de Juazeiro, Bahia.

Extração dos componentes de superfície das linhagens de *C. pseudotuberculosis*

As linhagens bacterianas T1 e VD57 foram cultivadas em meio BHI a 37°C, por 48 horas. A cultura foi então centrifugada a 3000 x g por 30 minutos a 4°C. A massa das bactérias foi lavada duas vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) e posteriormente adicionou-se a cada 2g da amostra 10 ml de PBS para ser realizada a

sonicação a 60HZ, usando cinco ciclos de 60 segundos cada (Branson Sonifier 450), em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 30 minutos a 4°C, o pellet foi liofilizado e submetido à extração com clorofórmio-metanol-água (5/10/4, vol/vol), de acordo com Giraldo e colaboradores (2002) com pequenas modificações (Figura 1). O material foi submetido à extração três vezes com 35 ml de clorofórmio-metanol-água durante uma hora sob agitação, seguida de centrifugação a 4.500 g por 20 minutos a 4°C; os sobrenadantes resultantes foram reunidos e o volume final foi reduzido por rota-evaporação. A solução final concentrada foi submetida à extração com 30 ml butanol-água (1/1, vol/vol) sob agitação por uma hora e centrifugadas a 4.500 g por 20 minutos a 4°C, o que resultou em uma fase butanólica e uma fase aquosa, as quais foram nomeadas F1 e F2, respectivamente; a fração F2 passou por este procedimento mais duas vezes, e as soluções finais foram reunidas e rota-evaporadas, resultando em um volume final de 6 ml e armazenadas a -20°C.

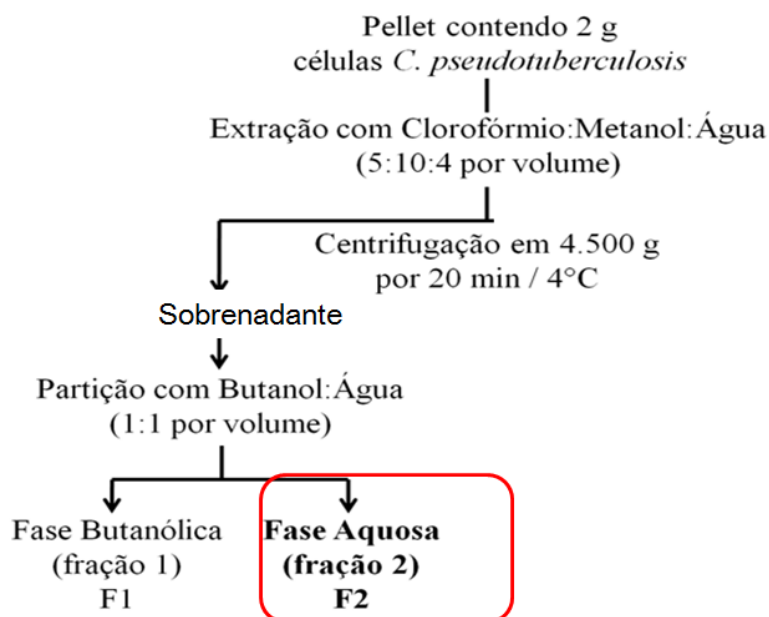


Figura 1. Fluxograma da estratégia utilizada para o fracionamento dos componentes estruturais do *C. pseudotuberculosis* com base em suas características de hidrofobicidade.

Caracterização do perfil eletroforético e do reconhecimento antigênico por IgM

As frações F2 obtidas da linhagem T1 e VD57 foram submetidas ao procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% com duodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Posteriormente, o gel foi corado com nitrato de prata ou eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose para realização do *Western Blot*. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com salina tamponada com fosfato adicionado de 1% de Tween 20 (PBS-T), acrescido de 5% de soroalbumina bovina por 12 horas a 4°C. Em seguida, foi incubada a 37°C por 1 hora com um *pool* de amostras de soro de ovinos coletados 21 dias após infecção experimental por *C. pseudotuberculosis*, diluídos 1:50 em PBS-T contendo 1% de leite desnatado; o *pool* utilizado foi lavado com esferas magnéticas sensibilizadas com proteína A (sheep anti-mouse IgG, Dynabeads®, Invitrogen), objetivando a remoção de anticorpos IgG e redução das ligações inespecíficas no *imunoblot*. Utilizou-se um *pool* de soros de animais confirmadamente negativos para a infecção por *C. pseudotuberculosis* por ELISA (Rebouças *et al.*, 2013) como controle negativo dos testes. Foi utilizado então o anticorpo de detecção anti-IgM de ovino conjugado com peroxidase (Bethyl) diluído em PBS-T na proporção de 1:250, sendo também incubado por uma hora. A revelação foi conduzida com cromógeno 4-cloro-1-naftol adicionado de substrato peróxido de hidrogênio. Como referencial de peso molecular, utilizou-se uma solução padrão de peso molecular pré-corada (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen).

Cromatografia de interação hidrofóbica

A fração F2 de ambas as cepas foram ressuspensas em 100mM acetato de amônio contendo 5% de propanol e submetidas a cromatografia de interação hidrofóbica utilizando a resina de Octyl-sepharose CL-4B (Sigma) como fase sólida e os eluentes foram compostos por um gradiente de propanol de 10% a 70%, escalonado a cada 5%. Após a passagem dos eluentes na coluna (12,5 ml por vez), estes foram recolhidos, reunidos por gradiente de propanol e rota-evaporados.

Método para recuperação de moléculas no gel de poliacrilamida

Para visualização do perfil cromatográfico das diferentes estirpes de *C. pseudotuberculosis* e obtenção de moléculas purificadas do gel de poliacrilamida 15%,

após a cromatografia foi realizada uma eletroforese e uma posterior extração pelo método de maceração por seringa (SME), descrito por Scherr e Ryan (2001). Os géis foram cortados horizontalmente, o material extraído (1 grama por vez) foi colocado em seringa de 3ml (Plastipack) e forçado através da abertura sem agulha para uma outra seringa e esse procedimento foi repetido por 5 vezes. O material foi coletado em tubo de eppendorff, foi adicionado 1 ml de água miliQ, a mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e incubada a temperatura ambiente durante mais 5 minutos. Em seguida, foi realizada uma centrifugação de 1.200 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi coletado, analisado numa eletroforese e utilizado para caracterização da molécula por espectrometria de massas.

Espectometria de massas (MS) da fração hidrofóbica F2 de ambas as linhagens bacteriana

Duas amostras das frações obtidas na cromatografia com 35% de gradiente de propanol das cepas de *C. pseudotuberculosis* (escolhidas após resultado de SDS-PAGE), e purificadas do gel, foram injetadas diretamente no aparelho ESI-q-tof (Micromass/Waters) com ionização no modo positivo, capilar 2500.0 v, temperatura da fonte de 80°C, energia do ion de 1.5 v gerando os espectros para análise. Essa etapa foi realizada em parceria com o Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Análises de eletroforese e dos espectogramas

A análise do perfil eletroforético em SDS-PAGE e do padrão de reconhecimento de antígenos pela imunoglobulina IgM foi conduzida através do software GelAnalyzer v.2010, sendo estabelecidos os pesos moleculares estimados de cada antígeno.

Os espectros de massa foram analisados no banco de dados online para lipídios – “Lipids maps”. Os perfis obtidos com cada uma das amostras obtidas após a purificação do gel de cada cepa foram unidos para uma análise final mais objetiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pouco se sabe sobre os mecanismos de patogenicidade de *Corynebacterias*. Muitas bactérias possuem adaptações que as permitem infectar e sobreviver no interior de uma célula específica. Alguns micro-organismos, como *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *C. pseudotuberculosis* podem sobreviver e se multiplicar dentro de fagócitos mononucleares, células especializadas em mecanismos citocidas potentes (HAHN *et al.*, 1981; HAMILTON *et al.*, 1987).

As espécies de *Corynebacterium* são caracterizadas por uma arquitetura complexa da parede celular contendo peptidoglicanos e, principalmente, lipídios complexos, os quais compõem cerca de 60% da estrutura total (BURKOVSKI, 2013). Diferenças entre concentração e tipos de lipídios influenciam diretamente a patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* e sua habilidade em formar granulomas (SULEIMAN *et al.*, 2006). Análises de composição de moléculas de membrana, como glicolipídios e lipídios vêm sendo utilizadas para avaliar, diferenciar e identificar gêneros, espécies e cepas bacterianas e parasitárias (COLOE *et al.*, 1984; SULEIMAN *et al.*, 2006; NIEHUS *et al.*, 2014).

No presente estudo foram isolados lipídios de diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis*, uma com alta e outra baixa patogenicidade, para avaliar a diferença entre perfis de cada uma das cepas. Após isolar e purificar as moléculas, foi feita caracterização das mesmas por meio de espectrometria de massas. A análise de moléculas por espectrometria de massas ainda é uma tarefa difícil, já que os tipos de ligações e os isômeros nem sempre são distinguíveis por MS, porém o desenvolvimento destas análises é indispensável, pois fornecem informações importantíssimas para caracterização de moléculas (SOUZA, 2008).

Os perfis eletroforéticos das frações F2 das cepas T1 e VD57 encontram-se representados na Figura 2. Diferenças foram constatadas entre o perfil de moléculas extraídas a partir de cada cepa; moléculas de peso estimado de 70 kDa, 58 kDa, 49 kDa, 22 kDa, 20 kDa, 19 kDa e 10 kDa foram visualizadas apenas na F2 de T1, enquanto que moléculas de peso de 40 kDa, 36 kDa, 26 kDa e 7 kDa foram detectadas apenas na F2 de VD57. Moléculas com peso estimado entre 7 kDa e 14 kDa apresentaram aspectos extenso e sombreado, o que as diferenciou das moléculas de maior peso, as quais se apresentaram com aspecto de bandas. Pesquisas desenvolvidas com *Rhodococcus equi* (GARTON *et al.*, 2002), *Corynebacterium glutamicum* (MISHRA *et al.*, 2008) e

Mycobacterium tuberculosis (TORRELLES *et al.*, 2009) apontam que moléculas com peso estimado entre 6 kDa e 15 kDa, com aspecto sombreado na eletroforese, são glicoconjugados; as extensas ramificações sacarídicas das moléculas, constituídas principalmente por arabinose e manose, são responsáveis pela aparência visualizada na eletroforese. No presente trabalho, moléculas compatíveis com essas descrições foram identificadas na fração F2. As diferenças visualizadas no perfil eletroforético das frações F2 das cepas T1 e VD57 indicam que a ocorrência de algumas moléculas estruturais do *C. pseudotuberculosis* pode ser cepa-específica.

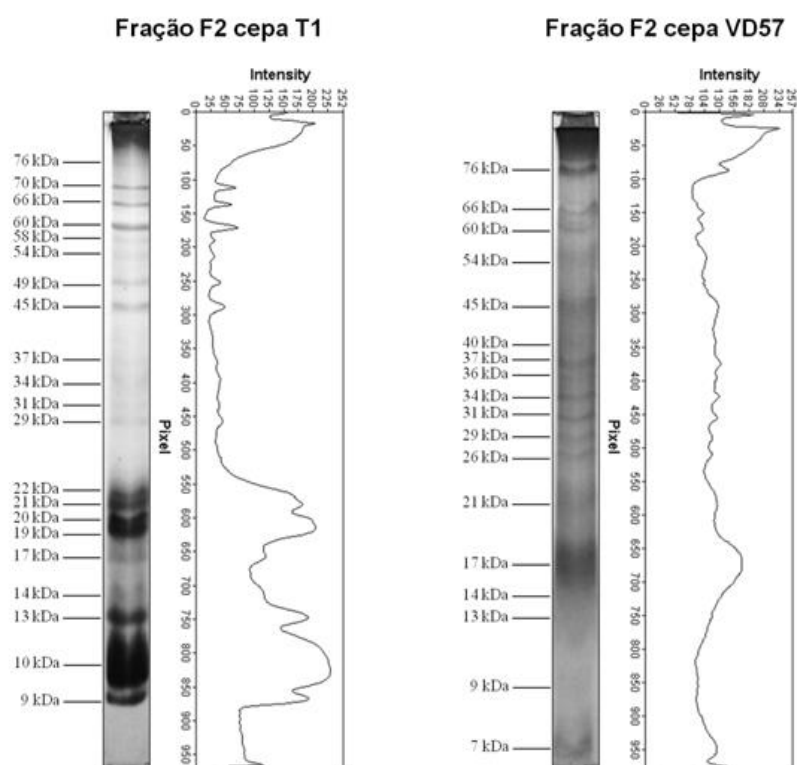


Figura 2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 15% das frações F2 de moléculas estruturais hidrofóbicas de *C. pseudotuberculosis* das cepas T1 e VD57 corados pelo nitrato de prata.

A análise de *Western Blot* realizada com pool de soros ovinos positivos para IgM anti-*C. pseudotuberculosis*, apresentada na Figura 3, constatou-se o reconhecimento de antígenos com peso molecular estimado de 11 kDa na fração F2 de ambas as cepas, com maior grau de intensidade na cepa de baixa patogenicidade. Os resultados utilizando o controle negativo não apresentaram nenhum reconhecimento de bandas e não foram mostrados. O reconhecimento por IgM é de suma importância, pois o anticorpo produzido na fase aguda de doenças infecciosas, e é responsável, juntamente com a imunidade inata, pelo controle inicial da disseminação bacteriana. Muito provavelmente o menor reconhecimento de antígenos de parede por IgM ocorre fazendo com que a cepa VD57 tenha um perfil de alta patogenicidade, pois não tem sua disseminação bem controlada pela ação de anticorpos, como ocorre com a cepa T1.

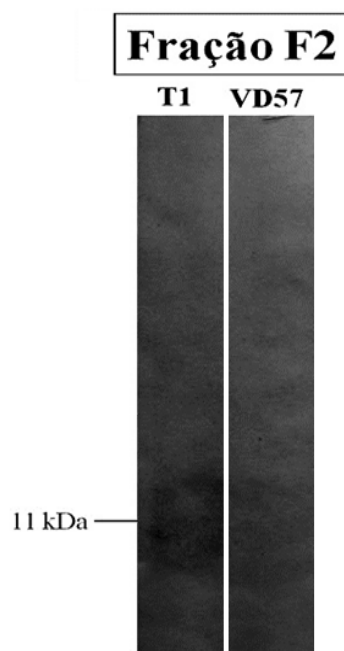


Figura 3. Perfil de reconhecimento por anticorpos IgM de antígenos estruturais das frações F2 extraídos de *C. pseudotuberculosis* das cepas T1 e VD57, detectando infecção aguda quando as membranas foram incubadas com pool de soros de ovinos infectados experimentalmente com o microrganismo no momento de 21 dias após a inoculação; um pool de soros de ovinos negativos para LC foi utilizado na incubação como controle negativo, e por não apresentarem reconhecimento antigênico algum estas amostras não foram incluídas na figura.

A cromatografia possibilitou separar moléculas das frações F2 das cepas T1 e VD57 conforme suas características de hidrofobicidade. Esses resultados estão representados nas Figuras 4a e 4b, respectivamente. Constata-se que os antígenos referidos anteriormente com peso molecular entre 7 kDa e 14 kDa foram eluídos em gradientes de propanol de 10% a 40% na fração F2 da cepa T1, enquanto que em gradientes de 10% a 70% na VD57. As moléculas eluídas a partir da VD57 que se encontram entre os gradientes de propanol de 25% e 40% apresentam um padrão de bandas diferente das moléculas encontradas nos mesmos eluentes relativos à cepa T1. Uma pesquisa realizada com *Corynebacterium glutamicum*, na qual se avaliou características estruturais de lipoglicanos, demonstrou que alterações qualitativas e quantitativas nos seus resíduos alteram a apresentação eletroforética das moléculas (TATITURI *et al.*, 2007). Considerando os resultados obtidos de eletroforese da fração total e das sub-frações cromatográficas de F2 de ambas as cepas, dentre os quais se verifica a presença de moléculas eluídas em diferentes gradientes de propanol e com visíveis diferenças na apresentação eletroforética, sugere-se a possível existência de diferentes compostos lipídicos entre as cepas T1 e VD57.

Após a corrida eletroforética das amostras oriundas da cromatografia as bandas entre 7 e 14 kDa (em vermelho na figura 4) foram purificadas do gel pelo método de extração por seringa (SCHERR e RYAN, 2001). Com a finalidade de caracterizar as moléculas após adquirir o espectro de massas (Figura 5), foi utilizado a plataforma online “Lipid Maps” descrita por de Fahy e colaboradores (2007). Essa plataforma foi desenvolvida com inúmeras ferramentas para executar tarefas tais como desenhar estruturas lipídicas e prever estruturas para dados obtidos com MS. As ferramentas online utilizadas foram a pesquisa na base de dados de mapas estruturais lipídicos utilizando o valor da massa (m/z) e análise MS para lipídios de *M. tuberculosis*.

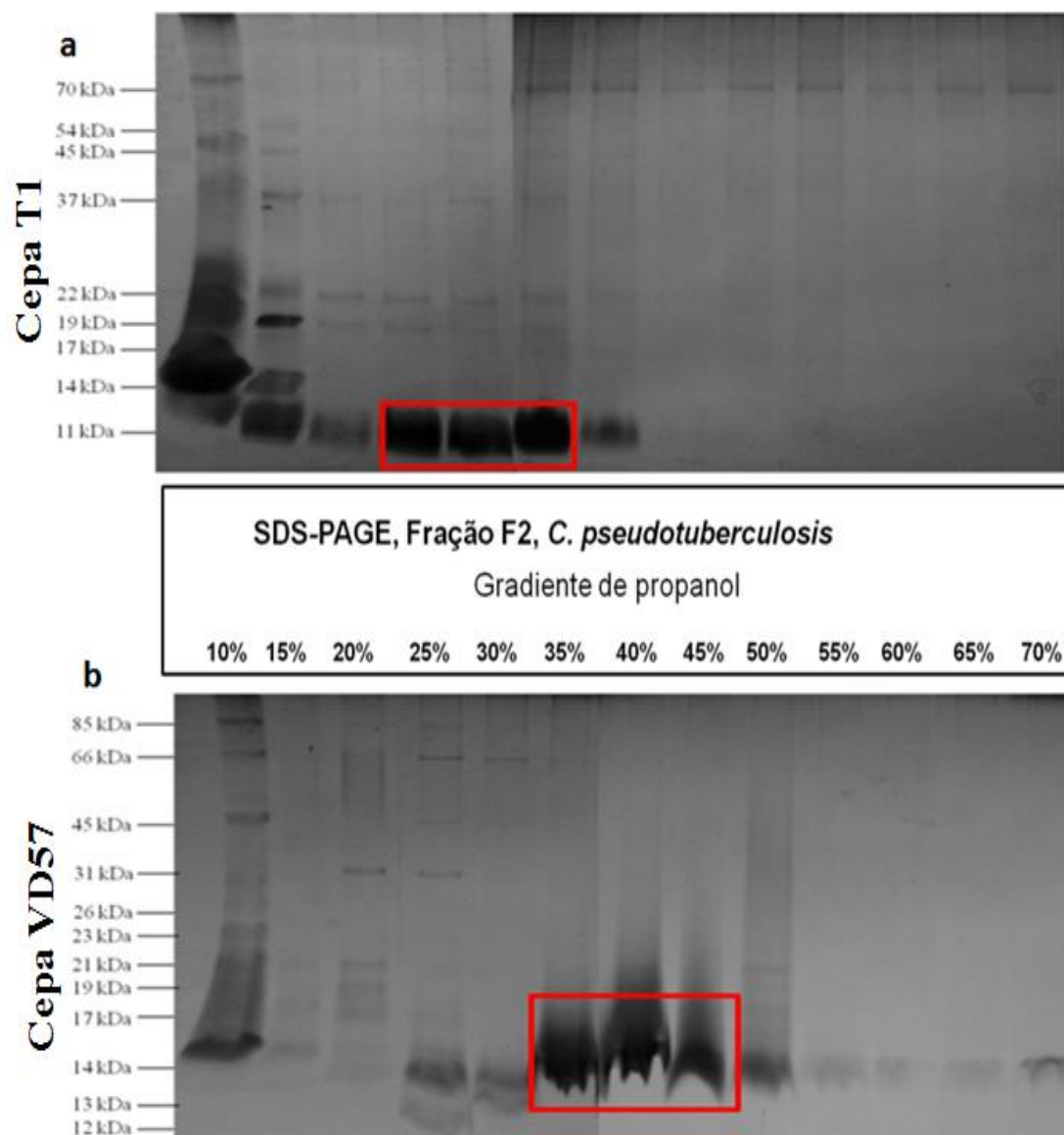


Figura 4. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 15% das sub-frações geradas pela cromatografia de interação hidrofóbica por diferentes gradientes de propanol (10% a 70%) a partir da fração F2 de *C. pseudotuberculosis* cepa T1 e VD57, corados pelo nitrato de prata. As amostras circundadas em vermelho foram extraídas do gel após nova eletroforese e purificadas pelo método SME.

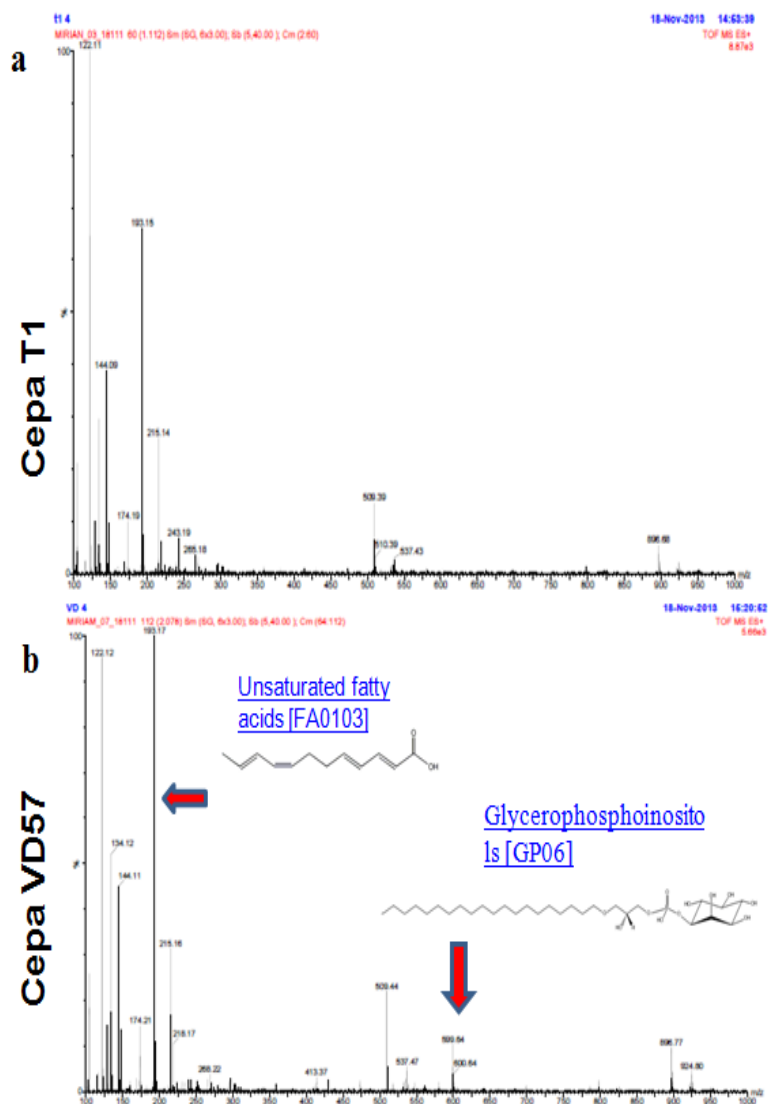


Figura 5. Espectrometria de massas das moléculas purificadas do gel de ambas as cepas de *C. pseudotuberculosis* no aparelho ESI-q-tof da Micromass/Waters. Em vermelho destaca-se as principais diferenças entre as cepas.

Como descrito na Tabela 1, ambas as cepas de *C. pseudotuberculosis* apresentaram espectros compatíveis com ácidos graxos, como os seguintes: palmítico, linoleico, araquidônico e mevalônico. O ácido palmítico é o ácido graxo mais comum encontrados em animais, plantas e micro-organismos (GUNSTONE *et al.*, 2007) e foi descrito em *C. pseudotuberculosis* tanto em cepa virulenta como atenuada através de cromatografia líquida/gasosa (SULEIMAN *et al.*, 2006). Ácido palmítico é o ácido graxo dominante na membrana plasmática de *C. glutamicum* (BURVOVSKY, 2013). Enfim, tanto o ácido palmítico, como o linoleico e o araquidônico são ácidos graxos de ocorrência natural. O ácido mevalônico foi isolado em culturas de diferentes micro-organismos (TAMURA *et al.*, 1958; DISH *et al.*, 1998). Uma vez que é conhecido que algumas bactérias necessitam de poucas quantidades desse composto para seu crescimento, ele pode passar despercebido em detecções realizadas em muitos organismos (O'LEARY, 1962). É um precursor de isoprenóides encontrados em quase todos os micro-organismos vivos (NOWICKA e KRUK, 2010).

Tabela 1. Composição dos ácidos graxos purificados de parede das cepas VD57 e T1 de *C. pseudotuberculosis*, de acordo com o obtido através de ensaio de espectrometria de massas.

Lipídios	Cepa de <i>C. pseudotuberculosis</i>	
	VD 57 (alta patogenicidade)	T1 (baixa patogenicidade)
Palmítico	Presente	Presente
Linoleico	Presente	Presente
Araquidônico	Presente	Presente
Mevalônico	Presente	Presente
Propionil carnitina	Ausente	Presente
Glicerofosfoglicerol	Presente	Presente
Glicerofosfocolina	Presente	Presente
Fosfocolina	Presente	Ausente
Glicerofosfoinositol	Presente	Ausente
Glicerol	Presente	Presente

Apenas a cepa T1, com baixa patogenicidade, apresentou o espectro referente ao ácido graxo propionil carnitina. Esse composto pode ser encontrado nos órgãos de mamíferos, em muitos animais inferiores, plantas e micro-organismos (FRAENKEL e FRIEDMANN, 1957). O papel da carnitina no crescimento e no metabolismo de micro-organismos pode variar dependendo da espécie e das condições ambientais, como concentração de sal e oxigênio (REBOUCHE e SEIM, 1998). Outro ponto a ser considerado nos espectros lipídicos é que a cepa VD57 apresentou o pico de 100% para 193 m/z, um ácido graxo insaturado, enquanto a cepa T1 de baixa patogenicidade apresentou valores em percentagem menor (entre 70 e 80%). Significando que a cepa de alta patogenicidade destacadamente possui mais moléculas desse ácido graxo insaturado do que a T1, fato que contribui para sua patogenicidade, visto que a capacidade de produção de ácidos graxos insaturados conduz uma maior gravidade na infecção (FOZO *et al.*, 2007).

Houve divergências nos resultados encontrados por Suleiman e colaboradores (2006) pesquisando ácidos graxos em diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis* e os encontrados aqui. Esse fato pode ter ocorrido devido a diferenças nas metodologias utilizadas. Moléculas lipídicas encontradas em altas concentrações nas membranas de muitos tipos celulares e que foram verificadas nas cepas de *C. pseudotuberculosis* estudadas foram glicerofosfoglicerois e glicerofosfocolina. Glicerofosfoglicerois são amplamente distribuídos na natureza e os mais abundantes componentes fosfolipídicos bacterianos. Apesar da glicerofosfocolina de 896 m/z ter sido detectada em ambas as cepas, sua provável quebra (698 m/z) só foi encontrada na cepa VD57 de alta virulência, assim como a fosfocolina (784 m/z), o que pode representar uma diferença de isômeros, ramificações laterais ou de biodisponibilidade. A colina e seus compostos relacionados são nutrientes essenciais que funcionam como substratos da maioria das vias metabólicas, refletindo a atividade da membrana ou aumento da população celular (TOAL *et al.*, 2005; VEDULIN, 2006).

A cepa VD57 apresentou moléculas diferenciadas nos seus espectros: os glicerofosfoinositois (600 e 614 m/z) que são catabólitos de fosfatidilinositol. Fosfatidilinositol (PI) são abundantes lipídios na membrana de Mycobacterias, presentes também em *C. glutamicum*, e um precursor de glicolipídios, como os fosfatidil manosídeos (PIMs), lipomanano (LM) e lipoarabinomanano (LAM) (HAITES *et al.*, 1995; Burvosky, 2013). É conhecido que tanto PIMs quanto LAM possuem

potentes atividades imunomodulatórias e que são importantes na patogênese de *M. tuberculosis* e *C. pseudotuberculosis* (MISHRA *et al.*, 2008). Sabendo da habilidade destas moléculas em facilitar a sua capacidade de infectar macrófagos e células dendríticas (TASCON *et al.*, 2000), inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-12 e TNF-alfa, assim como inibir a maturação fagossomal (NIGOU *et al.*, 2002; FRATTI *et al.*, 2003), sugerimos que os glicerofosfoinositois encontrados unicamente na cepa de *C. pseudotuberculosis* com alta patogenicidade esteja relacionado com diferenças na sua resposta imune em relação à cepa com baixa patogenicidade, ou seja, a presença dessas moléculas indica uma capacidade aumentada de causar LC.

A molécula de glicerol (924 m/z) foi encontrada em ambas as cepas, apesar de não aparecer na figura 5a. Esse glicerolípídio na sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido palmítico e oleico, se encontra presente em todas as células animais e vegetais, fazendo parte de sua membrana celular, na forma de fosfolipídios.

A partir desses resultados, podemos concluir que a cepa de alta patogenicidade se difere da menos patogênica por apresentar maiores quantidades de ácidos graxos insaturados e glicerofosfoinositois, o que contribui para sua grande capacidade em causar LC nos animais suscetíveis. Acreditamos que essa metodologia pode ser utilizada para distinguir cepas de *C. pseudotuberculosis* em relação a sua patogenicidade, porém mais estudos com o mesmo protocolo devem ser realizados para avaliar se outras cepas com distintos graus de patogenicidade obterão padrões de respostas semelhantes aos encontrados aqui.

Embora a utilização de antígenos estruturais purificados em testes sorológicos não tenha sido constatada na literatura para *C. pseudotuberculosis*. Fontaine e colaboradores (2006) verificaram que os títulos de anticorpos contra antígenos estruturais se elevaram primeiro, em relação aos níveis de anticorpos contra a exotoxina fosfolipase D (PLD) também foi demonstrado que todos os ovinos experimentalmente infectados com *C. pseudotuberculosis* desenvolveram anticorpos contra os antígenos estruturais enquanto que nem todos os animais elaboraram uma resposta imune humoral contra a PLD. Essas informações levam a crer que o sistema imune do hospedeiro é primeiro exposto a moléculas estruturais, para então num segundo momento ser exposto às exotoxinas, o que é coerente também do ponto de vista microbiológico, visto que após um determinado micro-organismo invadir o seu hospedeiro, os primeiros fatores

de virulência a serem expressos são adesinas e invasinas, moléculas normalmente associadas à fixação bacteriana nos tecidos; após a colonização primária do sítio de infecção, a segunda fase de expressão de fatores de virulência envolve a secreção de toxinas associadas à disseminação do micro-organismo. Dessa forma, fica evidente o potencial da utilização dos antígenos estruturais F2 de *C. pseudotuberculosis* para o aprimoramento de imunodiagnóstico e imunoprofilaxia.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- A combinação das técnicas de extração de moléculas estruturais hidrofóbicas por solventes orgânicos e de cromatografia de interação hidrofóbica seguida por eletroforese e purificação das amostras de baixo peso molécula do gel foi efetiva em gerar soluções antigênicas purificadas das cepas de *C. pseudotuberculosis* T1 e VD57 para avaliação por ES.
- As cepas de *C. pseudotuberculosis* estudadas apresentam distintos perfis de lipídios, esse fato pode estar relacionado com a patogenicidade de cada cepa e ajuda a compreender diferentes perfis eletroforéticos e de imunoreconhecimento, e esse fato pode estar relacionado com a patogenicidade de cada cepa.
- Moléculas da cepa T1, por demonstrarem bandas mais intensas no *imunoblot*, apresentam um maior potencial biotecnológico, portanto o seu extrato F2 é um candidato com potencial para imunodiagnóstico na fase aguda.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURVOSKI, A. Cell envelope of Corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. **ISRN Microb.** Vol. 2013, p. 11, 2013.

COLOE, P. J.; SINCLAIR, A. J.; SLATTERY, J. F.; BURKE, D. Differentiation of *Brucella ovis* from *Brucella abortus* by gas-liquid chromatographic analyses of cellular fatty acids. **J. Clin. Microb.**, 19: 896-898, 1984.

DISH, A.; SCHWENDER, J.; MULLER, C.; LICHTENTHALER, H. K.; ROHMER, M. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. **Biochem. J.** 333, 381±388, 1998.

DORELLA, F. A.; ESTEVAM, E. M.; PACHECO, L. G. ; GUIMARAES, C. T. ; LANA, U. G. ; BARSANTE, M. M. ; OLIVEIRA, S. C. ; MEYER, R. ; MIOSHY, A. ; AZEVEDO, V. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7368-7372, 2006.

FAHY, E.; SUD, M.; COTTER, D.; SUBRAMANIAN, S. LIPID MAPS online tools for lipid research. **Nucleic Acids Research**, Vol. 35, Web Server issue doi:10.1093/nar/gkm324, 2007.

FONTAINE, M.C., BAIRD, G. CONNOR, K.M., RUDGEA, K., SALES, J., DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, p. 5986–5996, 2006.

FOZO, E. M.; SCOTT-ANNE, K.; KOO, H.; QUIVEY, R. G. Jr. Role of Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Virulence of *Streptococcus mutans* **Infection and immunity**, p. 1537–1539, 2007.

FRAENKEL, G.; FRIEDMANN, S. **Carnitine. Vitam. Horm.** 15:73–118, 1957.

FRATTI, R. A. ; CHUA, J. ; VERGNE, I. ; DERETIC, V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, p. 5437–5442, 2003.

GARTON, N.J., GILLERON, M., DAN, H., GIGUERE, S., PUZO, G., PRESCOTT, J.F., SUTCLIFFE, I.C. A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 31722-31733, 2002.

GIRALDO, M.; CANNIZARRO, H.; FERGUSON, M. A.; ALMEIDA, I. C.; GRAZZINELLI, R. T. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.** 38:1453–1460, 2000.

GIRALDO, M.; PORTELA, R. W. D.; SNEGE, M.; LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R.; GAZZINELLI, R. T. Immunoglobulin M (IgM)-glycoinositolphospholipid enzyme-linked immunosorbent assay: an immunoenzymatic assay for discrimination between patients with acute toxoplasmosis and those with persistent parasite-specific IgM antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1400-1405, 2002.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. The Lipid Handbook with Cd-Rom. 3rd ed. **Boca Raton**: CRC Press. ISBN 0849396883 | ISBN 978-0849396885, 2007.

HAITES, R. E.; MORITA, Y. S.; McCONVILLE, M. J.; BILLMAN-JACOB, H. Function of phosphatidylinositol in mycobacteria. **The Journal of biological chemistry** 280, 10981-10987, 2005.

HAHN, H.; KAUFNANN, S. H. E. The role of cell mediated immunity in bacterial infections. **Rev. Infect. Dis.** 3:1221-1250, 1981.

HAMASUR, B.; HAILE, M.; PAWLOWSKI, A.; SCHRODER, U.; WILLIAMS, A.; HATCH, G.; HALL, G.; MARSH, P.; KALLENIOUS, G.; SVENSON, S. B. *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan-protein conjugates protect against tuberculosis. **Vaccine**, v. 21, p. 4081–4093, 2003.

HAMILTON, T. A.; and ADAMS, D. O. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. **Immunol. Today** 8:151- 158, 1987.

HARD, G.C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 5, p. 483–491, 1972.

MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* e seu hospedeiro caprino: Aspectos da Prevalência, do Diagnóstico e da Vacinação. **Tese de Doutorado em Imunologia**. Universidade Federal da Bahia, Brasil, Salvador. p. 83, 2003.

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

MISHRA, A. K.; ALDERWICK, L. J.; RITTMANN, D.; TATITURI, R.V.; NIGOU, J.; GILLERON, M.; EGGELING, L.; BESRA, G.S. Identification of an $\alpha(1-6)$ mannopyranosyltransferase (MptA), involved in *Corynebacterium glutamicum* lipomannan biosynthesis, and identification of its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 65, p. 503–1517, 2007.

MISHRA, A. K.; KLEIN, C.; GURCHA, S. S.; ALDERWICK, L. J.; BABU, P.; HITCHEN, P.G.; MORRIS, H.R.; DELL, A.; BESRA, G.S.; EGGELING, L. Structural characterization and functional properties of a novel lipomannan variant isolated from a *Corynebacterium glutamicum pimB'* mutant. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 277-287, 2008.

MOHAN, P., VATHSALA, M., JAYAPRAKASAN, V. Comparative characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in Kerala, India and reference strain. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 226-230, 2008.

MOURA-COSTA , L.F.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; VALE, V.L.C.; PAULE, B.J.A.; PORELA, R.W.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L.M.S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde´ goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, (126): 131–141, 2008.

MUCKLE, C.A., GYLES, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, p. 206–208, . 1982.

NIEHUS, S.; SMITH, T. K.; AZZOUZ, N.; CAMPOS, M. A.; DUBREMETZ, J. F.; GRAZINELLI, R. T.; SCHWARZ, R. T.; DEBIERRE-GROCKIEGO, F. Virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii* which differ in their glycosylphosphatidylinositol content induce similar biological functions in macrophages. **PLoS ONE**, Vol. 9:1, e85386. doi:10.1371/journal.pone.0085386, 2014.

NIGOU, J.; GILLERON, M.; ROJAS, M.; GARCIA, L.F.; THURNHER, M.; PUZO, G. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 945–953, 2002.

NOWICKA, B.; KRUK, J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinines. **Biochimica et Biophysica Acta** 1797, 1587–1605, 2010.

O'LEARY, W. M. Fatty acids of bacteria. **Bacteriological Reviews** 26, 429, 1962.

REBOUCHE, C. J.; SEIN, H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. **Annu. Rev. Nutr.** 18:39–61, 1998.

SCHEER, J.M.; RYAN, C.A. A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamid gels. **Analytical Biochemistry** 298, 130-132, 2001.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F.A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 50-55, 2010.

SOUZA, L. M. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SPECTOR, A. A.; YOREK, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. **Journal of Lipid Research** Volume 26, 2014.

SULEIMAN, K. M.; BOEHNEL, H.; BABIKER, S. H.; SAKI, A. Z. S. A. Cellular fatty acid profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its relation to pathogenicity. **Jou. of Anim. and Vet. Adv.** 5 (11), 943-945, 2006.

TAMURA, G.; K. FOLKERS. Identity of mevalonic and hiochic acids. **J. Org. Chem.**, 23:772, 1958.

TASCON, R.E., SOARES, C.S., RAGNO, S., STAVROPOULOS, E., HIRST, E.M., COLSTON, M.J. *Mycobacterium tuberculosis*-activated dendritic cells induce protective immunity in mice. **Immunology**. v. 99, p. 473–480, 2000.

TATITURI, R.V.V., ALDERWICK, L.J., MISHRA, A.K., NIGOU, J., GILLERON, M., KRUMBACH, K., HITCHEN, P., GIORDANO, A., MORRIS, H.R., DELL, A., EGGELING, L., BESRA, G.S. Structural characterization of a partially arabinosylated

lipoarabinomannan variant isolated from a *Corynebacterium glutamicum* *ubiA* mutant. **Microbiology**, v. 153, p. 2621–2629, 2007.

TOAL, F.; MURPHY, D. G. M.; MURPHY, K. C. Autistic-spectrum disorders: lessons from neuroimaging. **British Journal of Psychiatry**, v. 187, p. 395-397, 2005.

TORRELLES, J.B., DESJARDIN, L.E., MACNEIL, J., KAUFMAN, T.M., KUTZBACH, B.; KNAUP, R.; MCCARTHY, T. R.; GURCHA, S. S.; BESRA, G. S.; CLEGG, S.; SCHLESINGER, L.S. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase *pimB* reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death. **Glycobiology**, v. 19, p. 743-755, 2009.

VEDULIN, L. M. Ressonância magnética cerebral e espectroscopia de prótons por ressonância magnética na investigação de pacientes com multipolissacaridose. **Tese (Doutorado em Ciências Médicas)** – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

VERCELLONE, A.; NIGOU, J.; PUZO, G. Relationships between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis pathogenesis. **Front Biosci** 3,e149±163, 1998.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGOOD, H. M. S.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine e Growth Factor Reviews**, v. 14, p.467-477, 2003.

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

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

ARIAS, M. A.; JARAMILLO, G.; LOPEZ, Y. P.; MEJIA, N.; MEJIA, C.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* antigens specifically modulate CCR2 and MCP-1/CCL2 on lymphoid cells from human pulmonary hilar lymph nodes. **J Immunol** 179: 8381–8391, 2007.

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.

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

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.

BEHAN, A. W. *et al.* TNF-regulated recombinatorial macrophage immune receptor implicated in granuloma formation in tuberculosis. **PLoS Pathog.**, San Francisco, v. 7, n. 11, 2011.

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.

BIBERSTEIN, E. L.; KNIGHT, H. D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet. Rec.**, v. 89, p. 691-692, 1971.

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.

BRAITHWAITE, C.E.; SMITH, E. E.; SONGER, J. G.; REINE, A. H. Characterization of detergentsoluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet Microbiol.** Dec;38(1-2):59-70, 1993.

BRASIL. 2010. Ministério do planejamento, orçamento e gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, v.38, 2010.

BRAVERMAN, Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A. *et al.* The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Rev. Sci. Tech.**, v. 18, p. 681-690, 1999.

BRIELAND, J. K.; FLORY, C. M.; JONES, M. L.; MILLER, G. R.; REMICK, D. G.; WARREN, J. S.; FANTONE, J. C. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 12:104–109, 1995.

BROWN C. C.; OLANDER, H. J. Caseous Lymphadenitis of goats and sheep. Review. **Veterinary Bulletin.** (57): 1-12, 1987.

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

BURVOSKI, A. Cell envelope of Corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. **ISRN Microb.** Vol. 2013, p. 11, 2013.

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

CHATTERJEE, D.; ROBERTS, A. D.; LOWELL, K.; BRENNAN, P.J.; ORME, I. M. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. **Infect. Immun.** 60:1249–1253, 1992.

CHENSUE, S. W. Molecular machinations: chemokines signals in host-patogen interactions. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 14, n. 4, p. 821 – 835, 2001.

COLOE, P. J.; SINCLAIR, A. J.; SLATTERY, J. F.; BURKE, D. Differentiation of *Brucella ovis* from *Brucella abortus* by gas-liquid chromatographic analyses of cellular fatty acids. **J. Clin. Microb.**, 19: 896-898, 1984.

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.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K.; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Vet. Microbiol.** (75): 167–175, 2000.

DEVERGNE, O.; MARFAING-KOKA, A.; SCHALL, T.J.; *et al.* Production of the involvement of macrophages and endothelial cells. **J Exp Med**; 179:1689-94, 1994.

DHEDA, K. *et al.* The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. **Respirology. Carlton**, v. 15, n. 3, p. 433-450, 2010.

DISH, A.; SCHWENDER, J.; MULLER, C.; LICHTENTHALER, H. K.; ROHMER, M. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. **Biochem. J.** 333, 381±388, 1998.

DO CARMO, F. B.; GUIMARAES, A. S.; PAULETTI, R. B.; LAGE, A. P.; GONÇALVES, V. S. P.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; MYIOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G.; HEINEMANN, M. B. Prevalência de anticorpos contra a linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.79, n.2, p.293-298, 2012.

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. **Vet. Res.**, v. 37, p. 201–218, 2006.

EL-ENBAAWY, M. I.; SAAD, M. M.; SELIM, S. A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Egypt.**, v. 12, p. 13-20, 2005.

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

FAHY, E.; SUD, M.; COTTER, D.; SUBRAMANIAN, S. LIPID MAPS online tools for lipid research. **Nucleic Acids Research**, Vol. 35, Web Server issue doi:10.1093/nar/gkm324, 2007.

FARIA, G. A. de; MORAIS, O. R. de; GUIMARÃES, P. H. S. Análise da Ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Belo Horizonte: **SEBRAEMG, FAEMG, EMATER**, 122p, 2004.

FONTAINE, M.C., BAIRD, G. CONNOR, K.M., RUDGEA, K., SALES, J., DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, p. 5986–5996, 2006.

FOZO, E. M.; SCOTT-ANNE, K.; KOO, H.; QUIVEY, R. G. Jr. Role of Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Virulence of *Streptococcus mutans* **Infection and immunity**, p. 1537–1539, 2007.

FRAENKEL, G.; FRIEDMANN, S. Carnitine. **Vitam. Horm.** 15:73–118, 1957.

FRAGA, R. Aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com linhagem selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos. Tese de Doutorado em Imunologia. Universidade Federal da Bahia, Brasil, Salvador. p. 161, 2012.

FRATTI, R. A. ; CHUA, J. ; VERGNE, I. ; DERETIC, V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, p. 5437–5442, 2003.

GARTON, N.J., GILLERON, M., DAN, H., GIGUERE, S., PUZO, G., PRESCOTT, J.F., SUTCLIFFE, I.C. A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 31722-31733, 2002.

GIRALDO, M.; H. CANNIZARRO, M. A; FERGUSON, I. C.; ALMEIDA, A.; R. GAZZINELLI, R. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. **J. Clin. Microbiol.** 38:1453–1460, 2000.

GIRALDO, M.; PORTELA, R. W. D.; SNEGE, M.; LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R.; GAZZINELLI, R. T. Immunoglobulin M (IgM)-glycoinositolphospholipid enzyme-linked immunosorbent assay: an immunoenzymatic assay for discrimination between patients with acute toxoplasmosis and those with persistent parasite-specific IgM antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1400-1405, 2002.

GILLITZER, R.; WOLFF, K.; TONG, D.; *et al.* MCP-I mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions. **J Invest Dermatol.** 101:127-31, 1993.

GUIMARAES, A. S.; CARMO, F. B.; HEINEMANN, M. B.; PORTELA, R. W. D.; 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**, v. 7, n. 68, 19 p, 2011.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. The Lipid Handbook with Cd-Rom. 3rd ed. **Boca Raton**: CRC Press. [ISBN 0849396883](#) | [ISBN 978-0849396885](#), 2007.

HAITES, R. E.; MORITA, Y. S.; McCONVILLE, M. J.; BILLMAN-JACOB, H. Function of phosphatidylinositol in mycobacteria. **The Journal of biological chemistry** 280, 10981-10987, 2005.

HAHN, H.; KAUFNANN, S. H. E. The role of cell mediated immunity in bacterial infections. **Rev. Infect. Dis.** 3:1221-1250, 1981..

HAMASUR, B.; HAILE, M.; PAWLOWSKI, A.; SCHRODER, U.; WILLIAMS, A.; HATCH, G.; HALL, G.; MARSH, P.; KALLENIOUS, G.; SVENSON, S. B. *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan-protein conjugates protect against tuberculosis. **Vaccine**, v. 21, p. 4081–4093, 2003.

HAMILTON, T. A.; and ADAMS, D. O. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. **Immunol.** Today 8:151- 158, 1987.

HARD, G. C. Immunity in experimental *Corynebacterium ovis* in the mouse peritoneal cavity. **Res. Vet. Sci.** 12: 1439-1449, 1969.

HARD, G. C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. **Infect. Immun.**, v. 12, p. 1439-1449, 1972.

HEIN, W. R.; CARGILL, C. F. An abattoir survey of disease of feral goats. **Aust. Vet. J.**, v. 57, p. 498-503, 1981.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal 2010**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 15 jul. 2014.

JOLLY, R. D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. **NZ Vet J** 13: 141-147, 1965.

JOLLY, R. D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **J. Appl. Bact.** (29): 189-196, 1996.

KABA, J., KUTSCHKE, L., GERLACH, G.-F. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. **Vet. Microbiol.** (78): 155-163, 1991.

KURIA, J. K., MBUTHIA, P. G.; KANG'ETHE, E. K.; WAHOME, R. G. Caseous Lymphadenitis in Goats: The Pathogenesis, Incubation Period and Serological Response after Experimental Infection. **Veterinary Research Communications**. v. 25, p. 89-97, 2001.

KORBEL, D. S.; SCHNEIDER, B. E.; SCHAIBLE, U. E. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and Infection* 10, p. 995-1004, 2008.

LAN, D. T. B.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumour necrosis factor alpha: a gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **Microbiol. Immunol.** (42) : 863-870, 1999.

LANNELLE, G.; DAFPE, M. Mycobacterial cell wall and pathogenicity. **Res. Microbiol.** v. 142, p. 167-261, 1991.

LIMA, D. D. Estudo da resposta imune induzida por uma linhagem atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos criados em sistema extensivo. **Dissertação de Mestrado em Imunologia**, Universidade Federal da Bahia, 2009.

LUKACS, N. W.; KUNKEL, S. L.; STRIETER, R. M.; WARMINGTON, K.; CHENSUE S. W. The role of macrophage inflammatory protein 1a in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J Exp Med*; 177:1551-9, 1993.

MARQUES DA SILVA, T. R.; PETERSEN, A. L. O. A.; SANTOS, T. A.; ALMEIDA, T. F. ; FREITAS, L. A.R.; VERAS, P. S. T. Control of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium intracellulare* infections with respect to distinct granuloma formations in livers of BALB/c mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, agosto, 105(5), p.642-648, 2010.

MATSUSSHIMA, K.; MORISHITA, K.; YOSHIMURA, T.; LAVU, S.; KOBAYASHI, Y.; LEW, W.; APPELLA, E.; KUNG, H. F.; LEONARD, E. J.; OPPENHEIM, J. J. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.** 167:1883–1893, 1988.

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

MENDEZ-SAMPEIRO, P. Expression and regulation of chemokines in mycobacterial infection. **J. Infect., London**, v.57, n. 5, p. 374 -378, 2008.

MENZIES, P. I.; MUCKLE, C. A.; HWANG, Y. T.; SONGER, J. G. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using an *Escherichia coli* recombinant phospholipase D antigen for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Small Rum. Res.** (13): 193–198, 1994.

MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* e seu hospedeiro caprino: Aspectos da Prevalência, do Diagnóstico e da Vacinação. **Tese de Doutorado em Imunologia**. Universidade Federal da Bahia, Brasil, Salvador. p. 83, 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- γ production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Vet. Immunol. Immunopathology**. 107 (3-4): 249-254, 2004.

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

MISHRA, A. K.; ALDERWICK, L. J.; RITTMANN, D.; TATITURI, R.V.; NIGOU, J.; GILLERON, M.; EGGELING, L.; BESRA, G.S. Identification of an $\alpha(1-6)$ mannopyranosyltransferase (MptA), involved in *Corynebacterium glutamicum* lipomanann biosynthesis, and identification of its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 65, p. 503–1517, 2007.

MISHRA, A. K.; KLEIN, C.; GURCHA, S. S.; ALDERWICK, L. J.; BABU, P.; HITCHEN, P.G.; MORRIS, H.R.; DELL, A.; BESRA, G.S.; EGGELING, L. Structural characterization and functional properties of a novel lipomannan variant isolated from a *Corynebacterium glutamicum pimB'* mutant. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 277-287, 2008.

MOHAN, P., VATHSALA, M., JAYAPRAKASAN, V. Comparative characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in Kerala, India and reference strain. **Small Ruminant Research**, v. 74, p. 226-230, 2008.

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

MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; VALE, V. L. C.; PAULE, B. J. A.; PORELA, R. W.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L. M. S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde' goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, (126): 131–141, 2008.

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.

NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection of sheep: role of skin and dipping fluids. **Aust. Vet. J.** (50): 537–542, 1974.

NAGY, G. Ticks and caseous lymphadenitis in sheep: preliminary observations. **J. S. Afr. Vet. Med. Ass.**, v. 42, p. 227-232, 1971.

NIEHUS, S.; SMITH, T. K.; AZZOUZ, N.; CAMPOS, M. A.; DUBREMETZ, J. F.; GRAZINELLI, R. T.; SCHWARZ, R. T.; DEBIERRE-GROCKIEGO, F. Virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii* which differ in their glycosylphosphatidylinositol content induce similar biological functions in macrophages. **PLoS ONE**, Vol. 9:1, e85386. doi:10.1371/journal.pone.0085386, 2014.

NIGOU, J.; GILLERON, M.; ROJAS, M.; GARCIA, L.F.; THURNHER, M.; PUZO, G. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 945–953, 2002.

NOCARD. 'Bull., de l'Instik **Pasteur**, 116, 1893.

NOWICKA, B.; KRUK, J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinines. **Biochimica et Biophysica Acta** 1797, 1587–1605, 2010.

O'LEARY, W. M. Fatty acids of bacteria. **Bacteriological Reviews** 26, 429, 1962.

OPPENHEIM, J. J.; ZACHARIAE, C. O.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. **Annu. Rev. Immunol.** 9:617–648, 1991.

PACHECO, L. G.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L. P.; DORELA, F. A.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; FROTA, M. N. L.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; ALVES, F. S. F.; MYIOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **J. Med. Microbiol.** 56(4): 117 – 119, 2007.

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.; HART, R. A.; MERCY, A. R.; ELLIS, T. M. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Aust. Vet. J.** (72): 266–269, 1995.

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

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

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.

PEPIN, M.; OLIVER, M.; GOHIN, I. Celular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **J. Leukocyte Biol.** (56) : 666-670, 1994.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD J. P. A. Aspectos Epidemiológicos da Caprinocultura Cearense. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.5, p.1-14, 2000.

PRIESZ AND GUINARD. Journ. de me'd. vett. et de Zootech., **Lyons**, 1891.

PRESCOTT, J. F.; MENZIES, P. I.; HWANG, Y. -T. An IFN- γ assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Vet. Microbiol.** (88): 287- 297, 2002.

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 gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **J. Vet. Diagn. Invest.** 23:213-20, 2011.

REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; HANNA, S. A.; 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):1296-1302, 2013.

REBOUCHE, C. J.; SEIN, H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. **Annu. Rev. Nutr.** 18:39–61, 1998.

RIBEIRO, O. C. *et al.* Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. **Pesq. Vet. Brás.** (8): 27-29, 1988.

RIBEIRO O.C.; SILVA J.A.H.; OLIVEIRA S.C.; MEYER R.; FERNANDES G.B. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a Linfadenite caseosa. **Pesq. Agropec. bras.** v. 26, n.4, p. 461-465, 1991.

RHOADES, ER, AM COOPER, ORME, I.M. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** 63:3871–3877, 1995.

SADEK, M. I.; SADA, E.; TOOSI, Z.; SCHWANDER, S. K.; RICH, E. A. Chemokines Induced by Infection of Mononuclear Phagocytes with Mycobacteria and Present in Lung Alveoli during Active Pulmonary Tuberculosis. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, vol. 19, pp. 513–521, 1998.

SAUKKONEN, J. J.; BAZYDLO, B.; THOMAS, M.; STRIETER, R. M.; JOSEPH KEANE, J.; KORNFELD, H. β -Chemokines Are Induced by *Mycobacterium tuberculosis* and Inhibit Its Growth. **Infection and Immunity**, p. 1684–1693, 2002.

SCHEER, J. M.; RYAN, C. A. A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamid gels. **Analytical Biochemistry** 298, 130-132, 2001.

SCHREUDER, B. E. C., TER LAAK, E. A. e GRIESEN, H. W. An outbreak of caseous lymphadenitis in dairy goats: first report of the disease in Netherlands. **Vet. Q.** (8): 61–67, 1987.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. N. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, v.88, n.1, p.50-55, 2010.

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

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, n. 49, v. 2, p. 223-226, 1988.

SOUZA, L. M. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SPECTOR, A. A.; YOREK, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. **Journal of Lipid Research**, vol 26, 2014.

STRIETER, R. M.; CHENSUE, S. W.; BASHA, M. A.; STANDIFORD, T. J.; J. P. LYNCH, J. P.; BAGGIOLINI, M.; KUNKEL, S. L. Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor- α , lipopolysaccharide, and interleukin-1b. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 2:321–326, 1990.

SULEIMAN, K. M.; BOEHNEL, H.; BABIKER, S. H.; SAKI, A. Z. S. A. Cellular fatty acid profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its relation to pathogenicity. **Jou. of Anim. and Vet. Adv.** 5 (11), 943-945, 2006.

SUNIL, V.; MENZIES, P. I.; SHEWEN, P. E.; PRESCOTT, J. F. Performance of a whole blood IFN- γ assay for detection and eradication of caseous lymphadenitis in sheep. **Vet. Microbiol.** (128): 288–297, 2008.

TAKAHASHI, T.; MORI, Y.; KOBAYASHI, H.; *et al.* Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine *Corynebacterial* isolates based on the rDNA sequence. **Microbiol. Immunol.**, v. 41, p. 649-655, 1997.

TAMURA, G., AND K. FOLKERS. Identity of mevalonic and hiochic acids. **J. Org. Chem.**, 23:772, 1958.

TASCON, R.E., SOARES, C.S., RAGNO, S., STAVROPOULOS, E., HIRST, E.M., COLSTON, M.J. *Mycobacterium tuberculosis*-activated dendritic cells induce protective immunity in mice. **Immunology.** v. 99, p. 473–480, 2000.

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.

TATITURI, R.V.V., ALDERWICK, L.J., MISHRA, A.K., NIGOU, J., GILLERON, M., KRUMBACH, K., HITCHEN, P., GIORDANO, A., MORRIS, H.R., DELL, A., EGGELING, L., BESRA, G.S. Structural characterization of a partially arabinosylated lipoarabinomannan variant isolated from a *Corynebacterium glutamicum* ubiA mutant. **Microbiology**, v. 153, p. 2621–2629, 2007.

TAUB, D. D. P.; PROOST, W. J.; MURPHY, M.; ANVER, D. L.; LONGO, J.; VAN DAMME, J.; OPPENHEIM, J. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3, are chemotactic for human T lymphocytes. **J. Clin. Invest.** 3:1370–1376, 1995.

TOAL, F.; MURPHY, D. G. M.; MURPHY, K. C. Autistic-spectrum disorders: lessons from neuroimaging. **British Journal of Psychiatry**, v. 187, p. 395-397, 2005.

TORRELLES, J.B., DESJARDIN, L.E., MACNEIL, J., KAUFMAN, T.M., KUTZBACH, B.; KNAUP, R.; MCCARTHY, T. R.; GURCHA, S. S.; BESRA, G. S.; CLEGG, S.; SCHLESINGER, L.S. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase pimB reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death. **Glycobiology**, v. 19, p. 743-755, 2009.

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.** (17): 57–62, 1985.

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

VALDIVIA, J.; REAL, F.; ACOSTA, F.; ACOSTA, B.; DÉNIZ, S.; RAMOS-VIVAS, J.; ELAAMRI, F.; PADILLHA, D. Interaction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with ovine cells in vitro. **Vet. Pathol.** 49(4), 2012.

VEDULIN, L. M. Ressonância magnética cerebral e espectroscopia de prótons por ressonância magnética na investigação de pacientes com multipolissacaridose. **Tese (Doutorado em Ciências Médicas)** – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

VERCELLONE, A.; NIGOU, J.; PUZO, G. Relationships between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis pathogenesis. **Front Biosci** 3,e149±163, 1998.

VESOSKY, B.; ROTTINGHAUS, E. K.; STROMBERG, P.; TURNER, J.; BEAMER, G. CCL5 participates in early protection against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 6, p. 1153-65, 2010.

WALLIS, R. S., FUJIWARA, H.; ELLNER, J. J. Direct stimulation of monocyte release of interleukin-1 by mycobacterial protein antigens. **J.Immunol.** 136:193–196, 1986.

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

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR – based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infect. Dis.** (4): 337-348, 2004.

YERUHAM, I.; ELAD, D.; VAN-RAM, M.; SPHIGUEL, N. Y.; PERL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. **Veterinary Records** (40): 423-427, 1997.

YU, X.; ANTONIADES, H. N.; GRAVES, D. T. Expression of monocyte chemoattractant protein I in human inflamed gingival tissues. **Infect Immun**;61:4622-8, 1993.