

UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

Milton Galdino de Oliveira Neto

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓXIDO
NÍTRICO DURANTE A INFECÇÃO POR
Corynebacterium pseudotuberculosis EM
MODELO MURINO



PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA

Salvador
2011

MILTON GALDINO DE OLIVEIRA NETO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO DURANTE A INFECÇÃO
POR *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM MODELO MURINO**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer

SALVADOR – BA

2011

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

O48 Oliveira Neto, Milton Galdino.

Avaliação da influência do óxido nítrico durante a infecção
por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino /
Milton Galdino de Oliveira Neto. – Salvador, 2011.

81 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer Nascimento

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2011.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* 2. Animais de
laboratório. 3. Óxido Nítrico 4. Camundongos *Knockout* I.
Meyer, Roberto Nascimento. II Universidade Federal da Bahia.
III. Título.

CDU:616.028

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - ICBS - UFBA

Confere com o original

EM 23/12/11

Marcio Andrade Silva Santos
Marcio Andrade Silva Santos
Assessoria em Administração - ICBS / UFBA
Mat. 01790555

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Ao primeiro dia do mês de dezembro de dois mil e onze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a Defesa Pública da Dissertação do Pós-graduando Milton Galdino de Oliveira Neto, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores Roberto José Meyer Nascimento, Lília Ferreira de Moura Costa, Roberto Soares de Castro. O título da Dissertação apresentado foi AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO DURANTE A INFEÇÃO POR *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM MODELO MURINO. Ao final dos trabalhos os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento APROVADO

Profa. Dra. Lília Ferreira de Moura Costa APROVADO

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro APROVADO

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos:

Salvador, 01 de dezembro de 2011

Prof. Dr. *R. J. Meyer Nascimento*

Profa. Dra. *Lília Ferreira de Moura Costa*

Prof. Dr. *Roberto Soares de Castro*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por está ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e me dando força;

À minha esposa pela cumplicidade, carinho, compreensão e incentivo, que proporcionou a paz que eu precisava para concluir este trabalho;

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

À professora Vera Vale por todos os ensinamentos, treinamento e orientação indispensáveis ao desenvolvimento deste trabalho;

À professora Soraya Trindade pela amizade, atenção e total disponibilidade em ajudar e cooperar com o experimento;

Ao professor Ricardo Fraga pela paciência. Por todos os ensinamentos que aprendi nos nossos trabalhos de bancada, pela amizade que fica;

À Professora Lilia Moura Costa por toda atenção e orientações para colaborar com nossos experimentos;

À Professora Songeli Freire pela contribuição e assistência para a melhoria desta dissertação

À Heidiane, minha amiga, por dividir comigo todos os momentos de alegria e de tristeza durante o mestrado

À Marcos Costa Silva pela amizade e colaboração na realização dos experimentos.

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

Aos alunos de Iniciação Científica que tiveram participação importante na realização dos experimentos;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação por todos os ensinamentos adquiridos ao longo dessa jornada;

A todos os colegas e funcionários do Labimuno, que formam uma família maravilhosa e fazem com que as lamentações virem piadas;

A CAPES pela confiança e disponibilidade em ajudar nos meus estudos.

A FAPESB pela colaboração e auxílio na dissertação

Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser. Mas Graças a Deus, não somos o que éramos.

Martin Luther King

OLIVEIRA-NETO, Milton Galdino. **Avaliação da Influência do Óxido Nítrico durante a Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino.** 81f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2011.

RESUMO

A Linfadenite Caseosa, causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*), é uma enfermidade de alta prevalência nos rebanhos de pequenos ruminantes da região semi-árida brasileira, trazendo grandes prejuízos particularmente para os pequenos produtores, pois a criação desses animais é a principal atividade de subsistência nesta região. O presente trabalho teve como objetivo avaliar aspectos da resposta imune de camundongos da linhagem C57/Black 6 selvagem e C57/Black 6 *Knockout* para o óxido nítrico (KO-NO), durante a infecção experimental por *C. pseudotuberculosis*. A utilização de animais *Knockout* possibilitou a compreensão da atuação de alguns tipos celulares do sistema imune frente ao patógeno, já que se sabe que o óxido nítrico é um importante agente na eliminação de microrganismos intracelulares. Para tanto, foram utilizados e eutanasiados 28 animais em dois tempos (7 e 14 dias), divididos em quatro grupos, a saber: grupo 1 – controle – com 4 animais selvagens; grupo 2 - infectado por *C. pseudotuberculosis* – com 10 animais selvagens; grupo 3 – controle – com 4 animais KO-NO; e grupo 4 – infectado por *C. pseudotuberculosis* – com 10 animais KO-NO. Na metodologia avaliamos a suscetibilidade de camundongos KO-NO, na infecção, verificando que animais C57/Black 6 KO-NO são susceptíveis à infecção por *C. pseudotuberculosis* com mortalidade observada a partir do 4º dia, o que indica a importância dessa molécula na defesa inata contra essa bactéria. No estudo de células do lavado peritoneal os neutrófilos foram as células encontradas em maior número no infiltrado dos animais KO-NO, o que pode indicar um mecanismo compensatório pela ausência do óxido nítrico. Com o estudo do baço observou-se a presença de linfócitos, com predomínio de TCD8 entre as células esplênicas de ambos os grupos, o que sugere a importância dessa sub-população na resposta imune contra esse microorganismo. A partir da presença de granulomas verificou-se a maior presença nos animais KO-NO infectados com 7 dias, sendo os linfonodos os mais afetados, o que aponta também para uma tentativa compensatória de conter a infecção; constatou-se uma maior recuperação bacteriana de linfonodo mesentérico nos camundongos KO-NO, provavelmente devido a sua maior capacidade de escape. Foi realizado também o estudo de anticorpos séricos, através da detecção de IgG total e subclasses, o qual foi observado uma produção 14 dias pós infecção, tanto nos animais selvagens como nos KO-NO, similar aos animais controle, o que indica uma resposta humoral tardia por esse tipo de anticorpo para esse microorganismo. Os resultados obtidos sugerem a importância do óxido nítrico no processo de combate à infecção por este microorganismo, posto que os animais KO-NO para esta substância foram os mais afetados pelo processo infeccioso instalado.

Palavras chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*. óxido nítrico. camundongos *Knockout*.

OLIVEIRA-NETO, Milton Galdino. **Evaluation of the Influence of Nitric Oxide during infection by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a murine model.** 81f. Dissertation (Master's Degree) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia. Salvador, 2011.

ABSTRACT

The Caseous Lymphadenitis, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*), is a disease of high prevalence in herds of small ruminants in Brazilian semi-arid region, bringing heavy losses particularly for small producers, once the creation of these animals is the principal activity of subsistence in this region. This study aimed to evaluate aspects of the immune response of mice of the strain C57/Black 6 wild and C57/Black 6 *knockout* for nitric oxide (KO-NO), during experimental infection with *C. pseudotuberculosis*. The use of *Knockout* animals allowed us to understand the action of some cell types of the immune system against the pathogen, since it is known that nitric oxide is an important agent in the elimination of intracellular microorganisms. For this purpose, were used and euthanized 28 animals at two times (7 and 14 days), divided into four groups: Group 1 - control - with 04 wild animals; group 2 - infected by *C. pseudotuberculosis* - with 10 wild animals; group 3 - control – 4 KO-NO animals; and group 4 - infected by *C. pseudotuberculosis* - with 10 KO-NO animals. In the methodology we evaluated the susceptibility of KO-NO mice, in the infection, we verified that animals C57/Black 6 KO-NO are susceptible to infection by *C. pseudotuberculosis* with mortality observed from 4^o day, which indicates the importance of this molecule in the innate defense against this bacterium. In the study of cells from the peritoneal the neutrophils were the cells found in biggest number in the infiltrate of KO-NO animals, which may indicate a compensatory mechanism for the absence of nitric oxide. By studying the spleen was observed the presence of lymphocytes, predominantly CD8 between spleen cells from both groups, suggesting the importance of this subpopulation in the immune response against this microorganism. From the presence of granulomas it was verified the higher presence in KO-NO animals infected with 7 days, it being the lymph node the most affected, which also points to an compensatory attempt to contain the infection, it was found a greater bacterial recovery of mesenteric lymph node in KO-NO mice, probably due to its greater ability to escape. Was also performed the study the serum antibodies, by detection of total IgG and its subclasses, which was observed a production 14 days post infection, both in animals wild as in the KO-NO, similar to control animals, that indicate a late humoral response by this kind of antibody to the microorganism. The results suggest the importance of nitric oxide in the process of fighting the infection by this microorganism, since the *Knockout* animals for this substance were the most affected by the infectious process installed.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*. nitric oxide. *Knockout* mice.

LISTA DE FIGURAS

Fig.1	Animais naturalmente infectados com granuloma fechado	19
Fig.2	Desenho esquemático da síntese do NO a partir da L-arginina	26
Fig.3	Desenho esquemático da diluição no preparo do inóculo	39
Fig.4	Camundongos C57/Black 6 Selvagem e KO-NO com 6-8 semanas	40
Fig.5	Punção Cardíaca em KO-NO	41
Fig.6	Sangue obtido - punção cardíaca	41
Fig.7	Retirada de linfonodo mesenquimal	42
Fig.8	Linfonodo divulsionado para cultivo	42
Fig.9	Placa de material divulsionado para cultivo	42
Fig.10	Introdução de 1,5 ml de soro fisiológico na cavidade peritoneal (CP)	43
Fig.11	Volume recuperado da CP	43
Fig.12	Preparação do citoesfregaço	44
Fig.13	Camundongo pesado para análise	44
Fig.14	Baço retirado de camundongo KO-NO	45
Fig.15	Baço de C57/Black 6 Selvagem	45
Fig.16	Diluição de parte do baço com soro fisiológico para preparo da maceração	45
Fig.17	Maceração: obtenção de células esplênicas	45
Fig.18	Mastócitos em esfregaço de camundongos infectados. Objetiva de 100x	54
Fig.19(A)	Células do lavado peritoneal. Aspectos da celularidade (objetiva 10x)	54
Fig.19(B)	Células do lavado peritoneal. Identificação de Linfócitos e Neutrófilos (Objetiva 100x)	54
Fig.20 (A)	Microscopia óptica de coloração gram-positiva para <i>C. pseudotuberculosis</i> . Objetiva de 10x	64
Fig.20 (B)	Recuperação de <i>C. pseudotuberculosis</i> do linfonodo mesentérico de camundongos KO-NO	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de mortalidade	48
Gráfico 2 - Quantificação Células totais do Lavado Peritoneal	50
Gráfico 3 - Quantificação de células diferenciais do Lavado Peritoneal	53
Gráfico 4 - Média de Intensidade de Fluorescência de Moléculas CD4	57
Gráfico 5 - Média de Intensidade de Fluorescência de Moléculas CD8	58
Gráfico 6 - Comparação do peso do Baço de C57/Black 6 selvagem e KO-NO	59
Gráfico 7 - Detecção de IgG Total e subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3)	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Determinação da presença de granulomas	61
TABELA 2 - Principais regiões acometidas com granulomas	62
TABELA 3 - Determinação da migração bacteriana (UFC)	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
BHI	Infusão de cérebro e coração
CP	Cavidade Peritoneal
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GMP	Guanosina monofosfato cíclico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IgD	Imunoglobulina D
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KO-NO	<i>Knockout</i> para o óxido nítrico
LC	Linfadenite Caseosa
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NaCl	Cloreto de sódio a 0,9%
NO ³⁻	Nitrato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Forma neural da óxido nítrico sintase
cNOS	Forma constitutiva de óxido nítrico sintase
eNOS	Forma endotelial de óxido nítrico sintase
iNOS	Forma induzida de óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO-	Peroxinitrito

PBS-T	Solução Salina Tamponada com Fosfato com Tween 20
PLD	Fosfolipase D
ROS	Intermediários reativos do oxigênio
T1	Linhagem atenuada de <i>Corynebacterium pseudotubercu</i>
TA	Temperatura ambiente
Th1	Resposta Imune Tipo 1
Th2	Resposta Imune Tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	LINFADENITE CASEOSA	19
2.1.1	História	20
2.1.2	Distribuição e Economia	20
2.1.3	Transmissão	22
2.1.4	Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa	22
2.1.5	Imunidade mediada por citocinas	24
2.2	ÓXIDO NÍTRICO	26
2.2.1	Sistema imunológico e a atuação do NO	28
2.2.2	Síntese da Enzima iNOS e Mecanismo de ação do NO	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	HIPÓTESE	33
5	DESENHO EXPERIMENTAL	35
6	MATERIAIS E MÉTODOS	37
6.1	BACTÉRIAS	38
6.2	PREPARAÇÃO DO INÓCULO	38
6.3	PREPARAÇÃO DE MATERIAL DE ANTÍGENOS SECRETADOS DE <i>C. pseudotuberculosis</i>	39
6.4	ANIMAIS	40
6.5	OBTENÇÃO DE SANGUE POR PUNÇÃO CARDÍACA	41
6.6	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC) NO LIFONODO MESENQUIMAL	41
6.7	CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL	42
6.8	OBTENÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS	44
6.9	ELISA INDIRETO PARA DOSAGEM DE IgG E SUBCLASSES	46
6.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

7.1	CURVA DE MORTALIDADE	48
7.2	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS DO LAVADO PERITONEAL	49
7.3	QUANTIFICAÇÃO DO DIFERENCIAL DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DO LAVADO PERITONEAL	52
7.4	DETERMINAÇÃO DA MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE LINFÓCITOS CD4 E CD8	56
7.5	DETERMINAÇÃO DO PESO DO BAÇO DE CAMUNDONGOS	59
7.6	DETERMINAÇÕES DA PRESENÇA DE GRANULOMAS	60
7.7	DETERMINAÇÃO DAS PRINCIPAIS REGIÕES ACOMETIDAS COM GRANULOMAS	61
7.8	DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO BACTERIANA DE <i>C. pseudotuberculosis</i>	63
7.9	DETECÇÃO DE IgG TOTAL E DE SUBCLASSES (IgG1, IgG2A, IgG2B E IgG3) ATRAVÉS DE ELISA INDIRETO	64
8	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética	78
	ANEXO B – Declaração Revisão Ortográfica	79
	ANEXO C – Declaração Revisão da Língua Inglesa	80
	ANEXO D – Declaração Revisão Regras ABNT	81

1 INTRODUÇÃO

A caprinovinocultura é de grande importância econômica em diversas regiões do mundo e principalmente no nordeste brasileiro. O país conta atualmente com um rebanho de ovino e caprino que juntos, representam 32 milhões de cabeças, equivalente a 3,3% do efetivo mundial (LEITE, 2011). No cenário mundial, em número de animais a China tem o maior rebanho do mundo, seguida, em ordem decrescente, pela Índia, Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Reino Unido, Turquia e Espanha (COUTINHO, 2005).

Esses animais são os principais alvos do agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), conhecido também como “mal do caroço”, ocasionada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C. pseudotuberculosis*). Essa doença traz diversos prejuízos, como a queda na produtividade do rebanho, diminuição do peso do animal, o que acarreta na inferioridade da carne para o abate, assim como pela presença dos granulomas. O couro também sofre danos já que na maioria dos casos é feita a remoção do caroço, o que compromete a qualidade final do produto; somado a isto, há redução na margem de lucro da atividade pela necessidade de tratamento da doença; e contaminação da carne para consumo humano.

A transmissão da LC pode ocorrer pelo contato do animal sadio com elementos contaminados do ambiente, ou por contato com animais doentes com granulomas superficiais, ou pulmonares com exsudação (ELLIS et al., 1987). Pode acontecer ainda, por instrumentos ou soluções de banho pelo solo, pela vegetação, bem como, pelas fezes de animais infectados (NAIRN; ROBERTSON, 1974). O agente etiológico da linfadenite é capaz de sobreviver por até oito semanas no ambiente sem se multiplicar. A persistência do patógeno parece ser o principal fator responsável pela sua transmissão entre os pequenos ruminantes (AUGUSTIN; RENSHAW, 1986). A principal medida de controle tem sido a eliminação de animais infectados, gerando perdas significativas, principalmente para os pequenos criadores, os quais muitas vezes, possuem a criação como única fonte econômica. (ALVES; OLANDER, 1999).

A pesquisa traz a discussão do papel do óxido nítrico (NO) na avaliação do comportamento imunológico de camundongo C57/Black 6 Knockout para óxido nítrico (KO-NO) por se tratar de uma molécula de extrema importância na resposta imune, principalmente no início do processo infeccioso.

A carência de *kits* e reagentes no mercado para estudos com o modelo caprino ou ovino, animais hospedeiros naturais do patógeno, limita algumas vezes as pesquisas. Diante deste fato, o modelo murino vem sendo utilizado para estudos da doença, não apenas pelos aspectos semelhantes na patogênese em relação ao observado em pequenos ruminantes, como também pela grande abrangência do uso destes animais em todo o mundo. Outro fator da escolha por camundongos deriva dos bons resultados em estudos ao longo das últimas décadas, além dos resultados em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do laboratório de imunologia da Universidade Federal da Bahia (VALE, 2005; COSTA SILVA, 2010), e por se tratar de um animal de fácil criação e manipulação, fácil custo de manutenção, com uma grande diversidade genética e com metodologias já consolidadas de remoção de genes, originando camundongos *Knockout*. Observa-se a necessidade de realização de pesquisas *in vivo*, que venham acrescentar informações que favoreceram a compreensão da doença e para o controle da LC nas regiões dos produtores de pequenos ruminantes.

O NO tem sido descrito por vários autores como uma das mais importantes moléculas de defesa contra agentes infecciosos. O modelo de infecção por *C. pseudotuberculosis* pode auxiliar na elucidação da importância do NO ao usar protocolos de estudo com camundongos *Knockout* e selvagem. A partir de tais considerações, o objetivo deste estudo é avaliar aspectos da resposta imunológica de camundongos C57/Black 6 Selvagem e KO-NO, durante a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LINFADENITE CASEOSA

A LC é uma doença infecto-contagiosa causada por *C. pseudotuberculosis* uma bactéria que é caracterizada como um bacilo pleomórfico, Gram positivo, intracelular facultativo de macrófagos, imóvel, não esporulado, anaeróbico facultativo, com dimensões que variam entre 0,5 - 0,6 µm de diâmetro e 1-3 µm de comprimento, podendo apresentar forma cocóide, além de se apresentar ou formando grupamentos irregulares, pequenos, brancos e secos (BATEY, 1986; MERCHANT; PACKER, 1975; QUINN et al., 1994). É uma bactéria mesofílica, cuja temperatura ideal de crescimento é 37°C com um pH entre 7,0 e 7,2 (MERCHANT; PACKER, 1975).

A identificação de *C. pseudotuberculosis* pode ser feita através das suas características morfotintoriais e de crescimento em determinados meios de cultura, auxiliados por provas bioquímicas e pelo padrão de hemólise no ágar sangue (MOURA-COSTA, 2002). Os caprinos e ovinos são geralmente os maiores alvos e a infecção caracteriza-se pela formação de granulomas contendo pus (VALE et al, 2003). A doença pode ser apresentada na forma superficial e visceral. Segundo Alves e Pinheiro (2003) os granulomas localizam-se, inicialmente, nos linfonodos superficiais (Figura 1), podendo ser na região da mandíbula, abaixo da orelha, na escápula, e na região mamária. Apresenta-se também, nos gânglios internos (mediastínicos, torácicos) e órgãos como os pulmões, o fígado e, em menor escala, o baço, a medula e o sistema reprodutivo.

Figura 1 – Animais naturalmente infectados com granuloma fechado



Fonte: Arquivo do autor

Todavia, esse granuloma, que é um mecanismo de defesa do hospedeiro, torna-se um mecanismo de proteção para o patógeno, pois impede que anticorpos, bem como antibióticos, adentrem na estrutura devido à sua camada fibrosa (COSTA SILVA, 2010). Quando os linfonodos superficiais são afetados, ocorre acometimento da pele e dos tecidos subcutâneos do animal, sendo então, chamada de LC externa, onde a drenagem ou ruptura do granuloma pode levar a contaminação do meio ambiente, além de permitir a introdução do microrganismo causador dessa doença em animais saudáveis (NAIRN; ROBERTSON, 1974).

2.1.1 História

A descrição da *C. pseudotuberculosis* no século XIX foi pequena na Europa, talvez pela baixa ocorrência neste continente, porém, nessa mesma época foram relatados alguns casos na Turquia, Egito e nas Américas (GARCIA et al., 1987). A *C. pseudotuberculosis* foi isolada pela primeira vez em 1891 pelo veterinário Priez Nocard, com alterações similares a tuberculose do ovino. E assim, foi denominada *pseudotuberculose* (PINHEIRO et al, 2000).

Nocard em 1893 voltou a observar o microrganismo em um caso de pseudomormo em eqüino e no ano seguinte, Preisz descreveu o microrganismo detalhadamente, denominando-o de *Bacillus pseudotuberculosis ovis*. Em 1918, Ebersson sugeriu classificá-lo como *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Com a edição do Manual Bergey muitas das discrepâncias foram solucionadas e em 1923 foi denominado de *Corynebacterium ovis* (ANDRADE, 2007). Na 6ª edição do Manual Bergey, em 1948 ficou conhecida oficialmente como *C. pseudotuberculosis* (BROWN; ORLANDER; ALVES, 1987).

2.1.2 Distribuição e Economia

A caprinovinocultura é de fundamental importância sócio-econômica para o Nordeste, já que a produção de caprinos e ovinos representa uma opção na oferta de carne, leite e derivados, favorecendo o aspecto alimentar, especialmente da população rural. Segundo Leite (2011) o negócio envolvendo as duas espécies

atua como mais um atrativo para ocupar um grande contingente de pessoas, contribuindo de forma significativa para a fixação do homem no campo.

Esta atividade é desenvolvida em todo território nacional, porém com maior concentração nas regiões semi-áridas dos Estados Nordestinos (RIBEIRO; SILVA; PEREIRA FILHO, 1988). Nos últimos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2009, a Bahia é o Estado com o maior efetivo caprino com 30,2%, seguido por Pernambuco (17,9%). Em relação à criação de ovinos o Rio Grande do Sul respondeu por 23,5% do total de animais como maior produtor, seguido da Bahia, com 18,0%.

A criação dessas espécies vem sendo incrementada em outras regiões do país, a exemplo da região Sul tornando-se uma alternativa nutricional das populações de baixa renda, visando o consumo da carne, e principalmente do leite caprino (BARCELLOS; SILVA; MARQUES JR, 1987), bem como, a produção de queijos finos (GUIMARÃES et al., 1989), ou como substituto do leite bovino para pacientes com intolerância (STHELING; SOUZA, 1987).

Diante da conjuntura que se faz presente, o Nordeste brasileiro vem despontando ao longo dos anos, como área desta vocação pecuária, na exploração desses pequenos ruminantes domésticos. Essa demanda está baseada nas características de adaptação a climas desfavoráveis, o que é fortemente influenciado pelos seus hábitos alimentares. Outro fator positivo se dá pela característica reprodutiva de poliesteria contínua, ou seja, apresentam cio e ovulam ao longo de todos os meses do ano, onde o fotoperíodo não constitui fator que limite a reprodução, uma vez sejam atendidas às necessidades na alimentação, nutrição e contínua atenção na saúde dos animais (SIMPLÍCIO et al, 2006).

Os mais recentes registros de prevalência foram apresentados por Meyer (2004), que estudou a soroprevalência desta zoonose no semi-árido baiano, obtendo um percentual médio de 46,66%. Entretanto, dentre as três microrregiões estudadas, Baixo e Médio São Francisco evidenciaram prevalência de 58,01%, Piemonte da Diamantina, e a microrregião Nordeste apresentaram prevalências de 37,76% e

31,67% respectivamente. O autor acredita que as variações percentuais apresentam um comportamento relativamente homogêneo, quando se leva em conta a mesma região, e que provavelmente, estas diferenças percentuais estejam relacionadas com o tamanho da população caprina e com as densidades populacionais, que são maiores na região do Baixo e Médio São Francisco.

2.1.3 Transmissão

Entre os fatores de incidência da LC no Nordeste do Brasil pode-se relacionar o tipo de vegetação encontrada no bioma caatinga, o qual é caracterizado pela presença de pequenas árvores, arbustos com presença de espinhos, que, se contaminados com o microrganismo, ao serem consumidos pelos animais e/ou entrarem em contato com as suas peles, provocam ferimentos que servem como porta de entrada para a ação da bactéria (ASHFAQ; CAMPBELL, 1980; UNANIAN; SILVA; PANT, 1985).

A disseminação de *C. pseudotuberculosis* no meio ambiente deve-se a ruptura dos granulomas, cujo material purulento contém elevado número de bactérias, tendo esta uma capacidade de sobreviver no solo por período longo. Esse fato pode ser comprovado pelos estudos de Alves e Pinheiro (2003) onde mostram a sobrevivência e persistência do microrganismo em relação ao tempo em diferentes objetos como no próprio animal, que não tem tempo definido de instalação; na madeira, podendo permanecer por até uma semana; e na palha por três semanas; além do solo, por até oito meses.

2.1.4 Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa

A resposta primária à infecção por *C. pseudotuberculosis* é mediada por interações celulares e citocinas. As reações secundárias ocorrem, através de múltiplas vias, como complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe II que identifica macrófagos e várias subpopulações de linfócitos, organizadas em três regiões distintas, identificadas no interior de lesões encapsuladas onde há o recrutamento contínuo de linfócitos (GOMES, 2011).

A imunidade inata é a primeira defesa do organismo contra a entrada de agentes estranhos, e consiste nos mecanismos celulares e bioquímicos inerentes à infecção. As principais células efetoras da imunidade inata são os neutrófilos, fagócitos mononucleares e células NK “natural killer”. Estas são responsáveis pelo ataque aos microrganismos que ultrapassam as barreiras naturais do hospedeiro e penetram nos tecidos, ou na circulação. Os principais componentes da imunidade inata são as barreiras físicas e químicas, encontram-se maioritariamente na pele, e nas mucosas do trato respiratório e gastrointestinal, células fagocitárias e células NK, elementos do complemento e outras moléculas inflamatórias, além de citocinas. Esta linha de defesa também é detentora de inúmeras características e propriedades importantes, tais como a especificidade relativamente a estruturas partilhadas por determinados grupos de microorganismos; a diversidade limitada; não possui memória; e não apresenta reação contra o *self* (ABBAS; LICHTMAN, 2006).

A resposta imunológica humoral em animais infectados ou imunizados por *C. pseudotuberculosis* é comumente intensa e contribui para tentar efetivar o controle da infecção, porém de forma isolada não é capaz de eliminá-la, mas são capazes de impedir a disseminação do agente do local de infecção para os órgãos. A resposta mediada por células se constitui na principal arma do hospedeiro para combater o patógeno (MEYER, et al., 2005), como a ativação de macrófagos e neutrófilos. Dessa forma, o perfil de células de resposta Imune Tipo 1 (Th1) é o responsável pela indução da produção de citocinas essenciais para o controle da doença, como a Interleucina 12 (IL-12) que induz a resposta do tipo Th1, estimula a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α) e IFN- γ por células CD4⁺, CD8⁺, NK e macrófagos (TRINCHIERI, SCOOT, 1995; ABBAS, 2000).

Observa-se também a Interleucina 10 (IL-10) como citocina importante na regulação do sistema imune, pois bloqueia a ação ou produção de outras citocinas como a IL-12, TNF- α , IFN- γ , interleucina 4 (IL-4) e a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e MHC classe II, limitando assim a magnitude de ativação e efeito das citocinas liberadas por células T durante a resposta imune específica (PESTAKA et al., 2004).

Pépin et al. (1997) mostraram que o TNF- α teria relevante importância na fase inicial da infecção, e que a formação de granulomas está ligada à expressão de algumas citocinas como interferon gama (IFN- γ), TNF- α , IL-4, IL-2 e MCP-1. Outras células importantes são os linfócitos B-1, caracterizada por Chevallier et al. (1998) como um subgrupo dos linfócitos B. Os linfócitos B-1 apresentam características específicas que as diferem dos linfócitos B convencionais, por apresentarem em sua superfícies, marcadores de linhagem mielóide (MAC-1) e linfóide (linfócito T- CD5 e linfócito B – IgM, IgD e CD19). Em camundongos o linfócito B-1 pode originar-se no fígado fetal ou na medula, além de ser encontrado em grande quantidade no peritônio, com uma população que se auto renova e secretam IgM espontaneamente.

Diversos estudos apontam que *C. pseudotuberculosis* produz vários fatores de virulência. Para Songer (1997), os dois mais importantes no desenvolvimento da patogenia da doença são os ácidos micólicos e a exotoxina fosfolipase D (PLD), contribuindo para a inflamação, edema e disseminação do microrganismo durante a formação dos granulomas. A ação da PLD na disseminação do patógeno dentro do hospedeiro se dá pelo fato da exotoxina hidrolisar a esfingomielina, um componente importante da membrana, em colina e fosfato de ceramida (CARNE; ONON, 1978). A colina é liberada enquanto a ceramida fosfato fica associada com a membrana comprometendo as células do epitélio vascular, aumentando a permeabilidade capilar (CARNE; ONON, 1978; MUCKLE et al., 1992).

2.1.5 Imunidade mediada por citocinas

Mesmo apresentando uma resposta imunológica humoral a infecção por *C. pseudotuberculosis* potencializa a produção de variadas citocinas formando um complexo de interação entre as citocinas do perfil inflamatório e pró-inflamatório, regulatório e anti-inflamatório (COSTA SILVA , 2010).

O mesmo autor mostra que o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua aumentando a permeabilidade vascular recrutando neutrófilos e células mononucleares para o local da infecção, além de estimular a atividade microbicida

de neutrófilos e macrófagos, e de um agente indutor de coagulação contribuindo desta forma, como um importante agente na formação de granuloma.

A IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida por células de resposta Imune Tipo 2 (Th2) e mediadora de efeitos anti-inflamatórios, atuando primariamente em células fagocíticas e em células apresentadoras de antígenos, inibindo a transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-12, a expressão do MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias, bem como a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; MOORE et al., 2001).

A IL-2 é uma citocina produzida pelas células T CD4⁺, e em menor quantidade, pelas células T CD8⁺. Esta atua sobre as mesmas células que a produzem, funcionando como um fator de crescimento autócrino. Entre outras funções, estimula o crescimento das células NK e facilita sua ação citolítica. Age também sobre os linfócitos B na formação de anticorpos. Já o (IFN- γ) trata-se de uma citocina que promove a modulação da resposta imune pelo controle da expressão das moléculas de MHC classes I e II por diversos tipos de células. Participa da ativação e regulação da diferenciação de fagócitos induzindo a expressão de moléculas co-estimulatórias e a produção de produtos microbicidas como radicais de oxigênio e NO. Possui também a capacidade de regular a ativação e a diferenciação das células T CD4⁺, tornando esta citocina um componente chave no curso da resposta imune (MEYER et al., 2005; ABBAS; LINCHTMAN; PROBER, 2008).

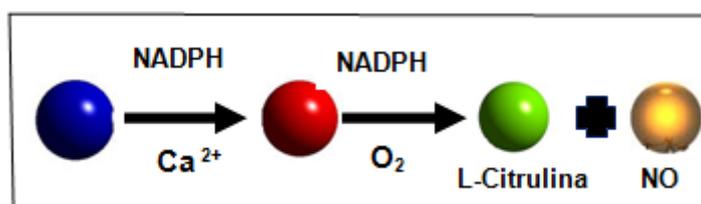
Interferon- γ é o principal indutor da função efetora na infecção de macrófagos com micobactérias, desenvolvendo também um papel significativo na formação e organização de granulomas na resposta contra esse patógeno (EHLERS et al, 2001). Essa citocina induz macrófagos a produzirem NO devido à ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), processo conhecido como via clássica ativação (HESS et al, 2001; WYNN, 2004). A produção de IFN- γ é induzida pela citocina IL-12 que tem sido descrita como uma citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos e células B em resposta a infecções bacterianas.

Em relação a interleucina 6 (IL-6), trata-se de uma citocina produzida por muitos tipos celulares, incluindo fagócitos mononucleares, que estimula a síntese de proteínas de fase aguda, bem como o crescimento de linfócitos B produtores de anticorpos. A Interleucina 17 (IL-17) trata-se de uma citocina pró-inflamatória que se expressa quando se ativam os linfócitos T de memória. Promove inflamação induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α em células endoteliais (ABBAS; LINCHTMAN; PROBER, 2008).

2.2 ÓXIDO NÍTRICO

O NO é um gás solúvel, de fórmula química NO altamente lipofílico sintetizado pelas células endoteliais, macrófagos e neurônios (MONCADA, 1999). Conforme figura abaixo, a síntese de NO se realiza por ação de uma enzima, a óxido nítrico sintase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina, que é transformada em um intermediário N^G-hidroxi-L-arginina formando NO e L-citrulina necessitando da presença de dois co-fatores, o oxigênio e o nicotinamida- adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (IACOPUCCI, 2010).

Figura 2 – Desenho esquemático da síntese do NO a partir da L-arginina



Fonte: Arquivo do autor

O NO é um importante sinalizador intracelular e extracelular, e atua induzindo a guanil ciclase, que produz guanosina monofosfato cíclico (GMP) que tem entre outros efeitos o relaxamento do músculo liso o que provoca, como ações biológicas, a vaso e broncodilatação (MONCADA, 1999), além disso contribui para inibir outros processos como a agregação plaquetária, a adesão de leucócitos ao endotélio e a produção de endotelina que são peptídeos (mensageiros químicos) que promovem constrição dos vasos sanguíneos e aumentam a pressão arterial (VILHENA, 2006).

Há duas décadas, considerava-se o NO um gás nocivo, tóxico e reativo, que existia livre na natureza por não mais do que alguns segundos. Com a descoberta que o NO é biossintetizado se transformou a visão que a ciência tinha sobre essa molécula. Os estudos mostraram que existia a produção endógena de NO e que ela está relacionada a inúmeros processos fisiológicos, desde a regulação da função cardiovascular, participação em processos ligados à memória, incluindo respostas do sistema imune (VILHENA, 2006).

Estudos subseqüentes, desenvolvidos por Hibbs et al. (1987) esclareceram a origem do NO³⁻, estabelecendo a L-arginina como o aminoácido essencial para a sua produção. Em 1987 Palmer et al. demonstraram que o fator de relaxamento derivado do endotélio era o NO. Da mesma forma que o NO contribui para a manutenção de vários fatores benéficos ao nosso organismo, ele também pode ter participação negativa em várias doenças, como exemplo, numa resposta inflamatória sistêmica - que geralmente é causada pela presença de um agente infeccioso na corrente sanguínea - pode levar a uma produção exagerada de NO pelos macrófagos, o que levaria a uma vasodilatação generalizada podendo causar hipotensão.

Muitos estudos estão sendo realizados sobre a influência do NO sobre algumas condições patológicas como asma, artrite reumatóide, lesões ateroscleróticas, tuberculose, esclerose múltipla, Alzheimer e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Diante do aumento da importância nas pesquisas, a investigação do papel do NO na sinalização celular tornou-se uma das áreas que mais se desenvolvem. Como exemplos da importância dessa área podemos citar a escolha do NO como molécula do ano em 1992 (Science), a criação em 1997 de um periódico dedicado exclusivamente a NO (Nitric Oxide: Biology and Chemistry), o Prêmio Nobel dado a Furchgott, Ignarro e Murad, em 1998 (VILHENA, 2006).

Para Moncada, Palmer e Higgs (1989) a investigação corrente e futura irá expandir o arsenal terapêutico de médicos para controlar um número importante

de doenças, através de intervenção na formação e no metabolismo de NO. As expectativas nesse campo de atuação têm estimulado o interesse na pesquisa em direção a uma lista cada vez maior de potenciais aplicações médicas.

2.2.1 Sistema imunológico e a atuação do NO

Os Neutrófilos e macrófagos são as principais células do sistema imune envolvidas na resposta contra *C.pseudotuberculosis* nos primeiros estágios da LC (JOLLY, 1965; HARD, 1975). Além dessas células, para o controle da infecção são necessárias a presença de subpopulações de linfócitos CD4 e CD8, bem como de macrófagos ativados (JOLLY, 1965; LAN et al, 1998).

O NO produzido por macrófagos é um importante agente na eliminação de patógenos intracelulares e a não produção desse efector em resposta aos componentes bacterianos explicaria o desenvolvimento de infecções exclusivamente crônicas observadas em pequenos ruminantes (GREEN; NACY; MELTZER, 1991). A incapacidade do macrófago em destruir *C.pseudotuberculosis* pode estar relacionada à não produção do NO quando essas células estão sob estímulo dos antígenos desse patógeno (BROGDEN et al., 1990).

A função do NO no sistema imunológico é bem diferente do que em neurônios ou na vasodilatação. Macrófagos contêm uma terceira forma de enzima que é a iNOS é induzida por agentes citotóxicos. A ativação de células TCD4+ leva à produção de IFN- γ , que ativa os macrófagos induzindo à produção de NO e conseqüentemente a destruição da bactéria (MACHADO et al, 2004).

Muitos outros tecidos podem apresentar também a iNOS, incluindo as células do endotélio vascular, do músculo liso, além das células nervosas, porém ao contrário da forma neural de óxido nítrico sintase (nNOS) e da forma endotelial de óxido nítrico sintase (eNOS), essa iNOS não depende de Ca^{+2} (VILHENA, 2006). Já foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas respectivas da forma

constitutiva do óxido nítrico sintase (cNOS) e iNOS. São semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (isoforma I), 12 (isoforma II) e a isoforma III no cromossomo 17 (WANG; MARDSEN, 1995).

Segundo estudos de Stuehr et al. (1991) a enzima cNOS está presente no cérebro e inicialmente foi purificada no cerebelo do camundongo e do porco. Esta proteína, atualmente clonada de cérebros humanos, mantém uma seqüência de aminoácidos altamente conservada entre as espécies, ocorrendo 93% de identidade entre a cNOS de humanos e camundongos. A eNOS ou Isoforma III é expressa constitutivamente nas células endoteliais podendo também ser chamada de EC-NOS “endothelial constitutive NO synthase”, (POLLOCK et al., 1991). A iNOS ou Isoforma II não é expressa constitutivamente, ou seja, não está presente de modo habitual, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolisacárideos bacterianos como também através de citocinas.

A ligação de bactéria a macrófagos, particularmente ligação via receptores tipo Toll, resulta na produção de TNF- α , que age de maneira autócrina para induzir a expressão do gene da iNOS resultando na produção de NO. Se a célula é também exposta ao IFN- γ é produzido NO adicional. O NO liberado pela célula é tóxico e pode matar também microrganismos que estiverem próximos ao macrófago (MAYER, 2006).

2.2.2 Síntese da Enzima iNOS e Mecanismo de ação do NO

A síntese da iNOS se inicia a partir da indução por citocinas. As sequências de DNA do macrófago responsáveis pela síntese desta enzima são sensibilizadas para formar o RNA mensageiro, sendo liberado posteriormente para o citosol onde acontecerá a tradução. Sendo assim, produzida a proteína que na presença de co-fatores sofrerá enovelamento, tornando-se ativa, formando a enzima iNOS, que começa a sintetizar NO a partir de L-arginina. No interior do macrófago, o NO gerado difunde-se em todas as direções, próximas ao local onde foi produzido (VILHENA 2006). Segundo Dusse, Vieira e Carvalho (2003) o NO resultante da

ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório.

O mecanismo de ação direta do NO se dá pela sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do patógeno (JAMES, 1995). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular. Nas infecções, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido (O_2^-) resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar aspectos da resposta imunológica de camundongos C57/Black 6 Selvagem e KO-NO, durante a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

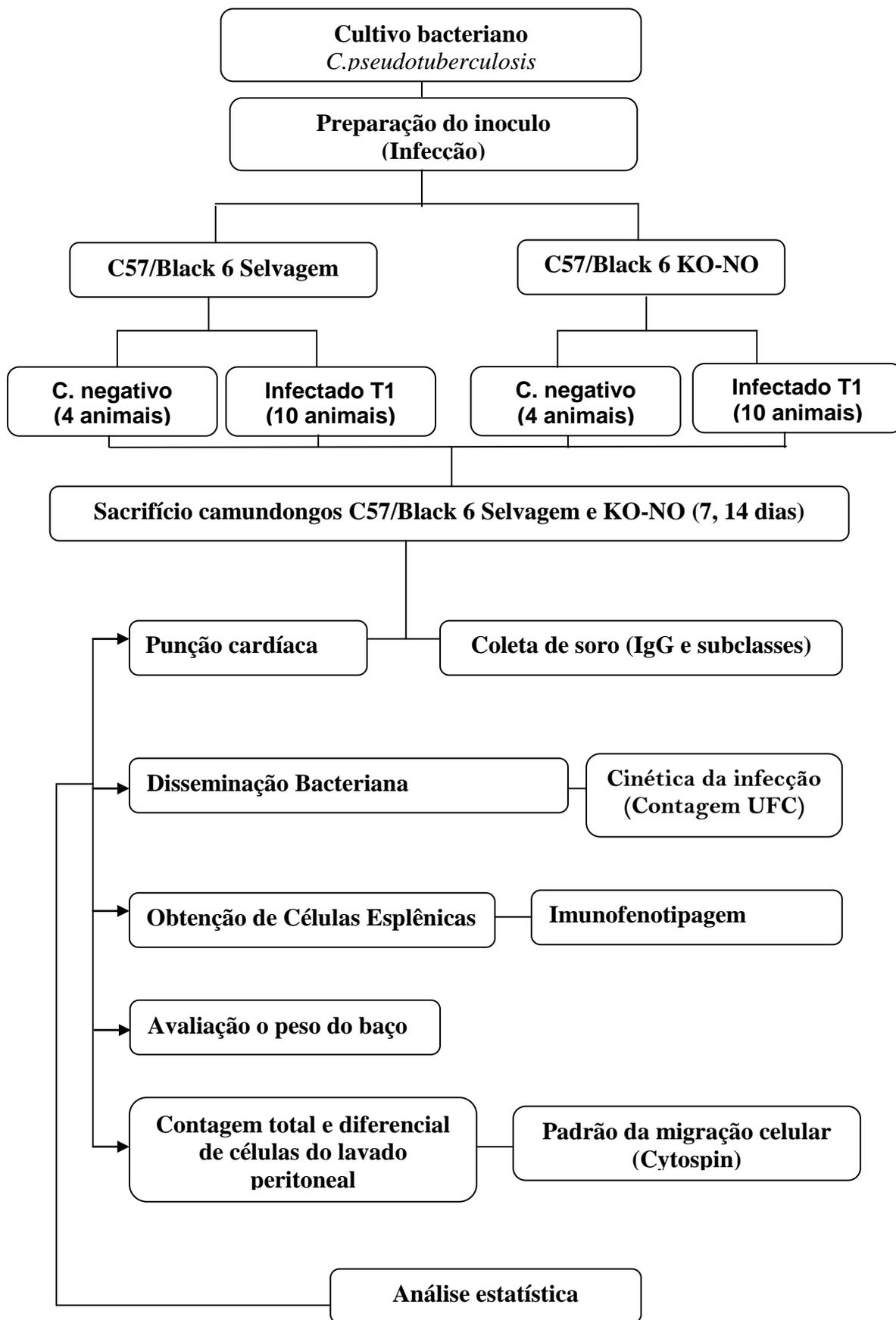
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a suscetibilidade de camundongos KO-NO, na infecção por *C. pseudotuberculosis*;
- Determinar o padrão da migração celular para a cavidade peritoneal em camundongos infectados por *C. pseudotuberculosis*;
- Comparar o peso do baço entre os grupos, após infecção por *C. pseudotuberculosis*;
- Estudar a disseminação da infecção por *C. pseudotuberculosis* através da contagem de unidades formadoras de colônias no linfonodo mesentérico;
- Analisar a resposta imune humoral (produção de anticorpos totais e subclasses) de camundongos infectados por *C. pseudotuberculosis*;
- Avaliar a resposta imune celular de moléculas CD4 e CD8 durante a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

4 HIPÓTESE

O NO é um importante mediador da resposta imunológica na infecção por *C. pseudotuberculosis* contribuindo para minimizar o processo imunopatológico.

5 DESENHO EXPERIMENTAL



6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 BACTÉRIAS

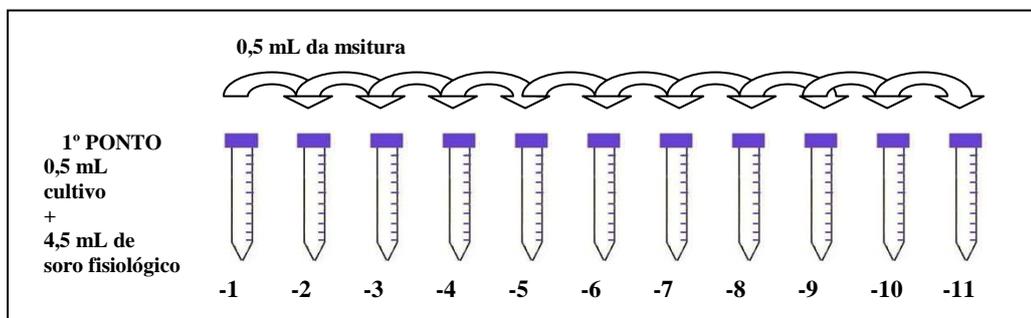
Foi utilizada uma linhagem de *C. pseudotuberculosis*, provenientes da coleção do laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) – UFBA denominada Linhagem atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (T1). Trata-se de uma linhagem que vem sendo trabalhada em muitos experimentos no laboratório do instituto de ciências da saúde. A linhagem foi identificada pelo teste “API coryne” (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França), semeada em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e posteriormente cultivadas a 37°C, por 48 horas. Essa linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis* foi isolada, a partir de granuloma de linfonodo caprino, na região de Santa Luz no estado da Bahia. Foi considerada naturalmente atenuada por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa que os demais isolados selvagens. (DORELLA et al., 2006; MOURA-COSTA et al., 2008).

6.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

A linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis* foi cultivada em meio BHI por 72 horas a 37°C em tubos de 5 mL. Após este período, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. A massa bacteriana foi então ressuspensa em 5 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl a 0,9%) e homogeneizada em vortex. Para ajuste da concentração em unidades formadoras de colônias (UFC/mL), foram feitas 11 diluições decimais em solução fisiológica. Para isto foram usados 11 tubos com 4,5 ml desta solução. Foram retirados 0,5 ml da suspensão bacteriana e colocados no primeiro tubo com 4,5 ml de solução fisiológica. Este tubo foi marcado como 10^{-1} correspondendo à diluição de 1:10. Os demais tubos seguiram o mesmo processo, sempre com o inóculo correspondendo a 0,5 ml da diluição anterior, agitada no vortex, conforme figura 3. Posteriormente foram usados 100uL das cinco últimas diluições que foram semeados por disseminação em agar BHI, com auxílio de uma alça de *Drigalsky*. Este procedimento foi feito em duplicata para cada diluição. Após 48 horas a 37°C foram separadas as duplicatas da diluição que apresentou entre 30 e 300 colônias. Foram contadas as colônias de cada uma das duas placas, estabelecida

a média do número de colônias e multiplicado pelo valor da diluição. Desta forma foi possível estimar o número de UFC/mL.

Figura 3 – Desenho esquemático da diluição no preparo do inóculo



Fonte: Arquivo do autor

6.3 PREPARAÇÃO DE MATERIAL DE ANTÍGENOS SECRETADOS DE *C. pseudotuberculosis*

Para a realização dos ensaios imunoenzimáticos para detecção da resposta imune humoral dos camundongos infectados foram produzidos 3 litros de cultura em caldo BHI contendo a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*, mantida a 37°C por 72 horas. Nesse processo, a bactéria cresce na superfície do meio. Na centrifugação levou-se em conta o nivelamento do líquido, para o equilíbrio na centrífuga. O meio com a bactéria foi colocado na rotação de 12.000g por 30 minutos. Após esse tempo o sobrenadante no fluxo laminar, foi filtrado, usando bomba de filtro.

Após o término da filtragem, colocou-se o material em *beckers* de 3 litros e acrescentou-se o sulfato de amônia a 30%, que ioniza as proteínas, formando um sal. Essas proteínas se agregam e precipitam. O conteúdo dos *beckers* tiveram o pH ajustado em 4,0 com ácido clorídrico (HCl), acrescentando-se após butanol. Para cada litro de sobrenadante acrescenta-se 1 litro de butanol. Os balões devem ser homogêneos fortemente, sendo que o conteúdo de cada balão deverá ser colocado em *beckers*. Durante esse processo, o material ficou de repouso por 1 hora. O butanol como é mais denso que o meio e do que as proteínas, este fica sobre os dois. O anel protéico no *becker* foi coletado com uma

pipeta e colocado em um tubo falcon de 50 ml, centrifugados e o antígeno colocado no saco de diálise. Com o uso de um Becker de 1 litro, colocou-se a solução de tampão fosfato, onde foram diluídos 20 ml de tampão para 1 litro de água destilada. Em seguida foi colocado o saco de diálise, submergindo no tampão fosfato. Colocou-se dentro do Becker um agitador magnético onde a solução ficou a 4º C. O tampão foi trocado de 12h em 12h, por 48 horas.

6.4 ANIMAIS

Foram utilizados, no experimento, 28 camundongos, sendo 14 animais C57/Black 6 KO-NO e 14 camundongos C57/Black 6 selvagens (Figura 4), com idades entre 6 - 8 semanas, do sexo feminino, adquiridos no Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, da fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). Durante o experimento os animais foram mantidos no biotério do laboratório de imunologia da Universidade Federal da Bahia. A pesquisa desenvolvida foi aprovada pelo comitê de ética no uso de animais do Instituto de ciências da Saúde sob o número 006/2010. Os animais de cada espécie foram divididos em 2 grupos, organizados da seguinte forma:

- 08 animais para o grupo controle (4 Selvagens e 4 KO-NO)
- 20 animais infectados por *C. pseudotuberculosis* (sendo 10 do grupo selvagem e 10 do grupo KO-NO)

Figura 4 – Camundongos C57/Black 6 Selvagem e KO-NO com 6-8 semanas



Fonte: Arquivo do autor

6.5 OBTENÇÃO DE SANGUE POR PUNÇÃO CARDÍACA

Foi aberta a cavidade torácica dos animais, observando os batimentos cardíacos ainda presentes. Apoiou-se o coração com uma pinça introduzindo a agulha (tamanho 25x0,7), acoplada em uma seringa de 5mL. Em seguida aspirou-se o máximo de sangue possível podendo retirar e reintroduzir a agulha várias vezes (Figura 5).

Fig. 5 - Punção Cardíaca em KO-NO



Fonte: Arquivos do autor

Fig. 6 – Sangue obtido - punção cardíaca



Fonte: Arquivos do autor

Dispensou-se todo o sangue obtido em um *ependorf* devidamente identificado (figura 6). O sangue foi incubado a temperatura ambiente (TA) durante 01 a 02 horas para coagular. Em seguida, centrifugou-se a 1500g por 10 minutos, em TA. O soro foi retirado e acondicionado em outro *ependorf* devidamente identificado. Em seguida acondicionou-se o soro dos animais em freezer na temperatura de -20° C.

6.6 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA (UFC) NO LINFONODO MESENQUIMAL

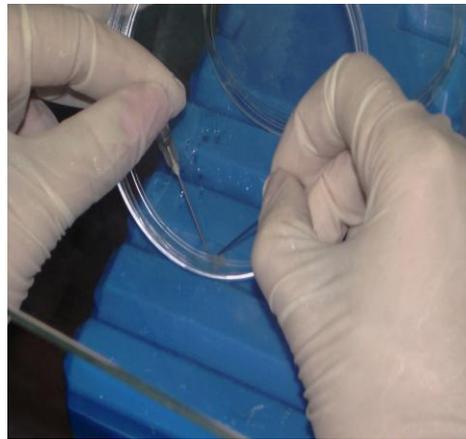
O linfonodo foi removido assepticamente (figura 7) e posteriormente foi divulsionado/macerado usando-se duas agulhas estéreis em 500 μ L de solução fisiológica estéril, conforme figura 8. A seguir 100 μ L desta suspensão foi semeada por disseminação em Agar BHI por 48 horas a 37°C, como observado na figura 9. Após este período foi estabelecida a contagem das colônias,

contando-se as colônias formadas e multiplicando-se por cinco (lembrando que o material foi diluído em 500mL e só foram semeados 100 mL, ou seja 1/5 do total).

Fig.7 – Retirada de linfonodo mesenquimal Fig.8 - Linfonodo divusionado para cultivo



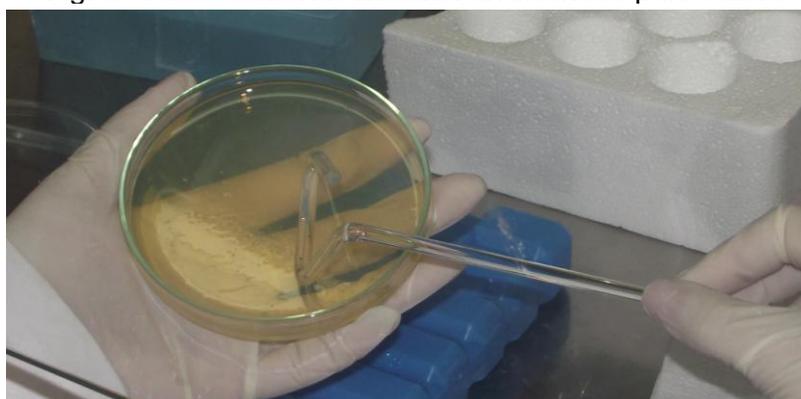
Fonte: Arquivos do autor



Fonte: Arquivos do autor

Essa metodologia foi aplicada para avaliação da migração bacteriana, baseada como visto por Paes-Jorge (2010) a qual avaliou a disseminação do fungo *Agaricus blazei* em camundongos Balb/C.

Fig. 9 - Placa contendo material divusionado para cultivo



Fonte: Arquivos do autor

6.7 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS DO LAVADO PERITONEAL

Foi feita uma incisão na região abdominal (na altura da linha alba – rebatendo apenas a pele sem abrir a cavidade abdominal) sempre em condições estéreis no

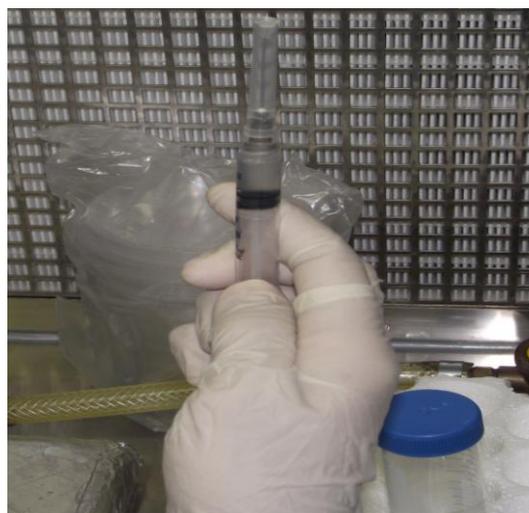
fluxo laminar. Em seguida foram introduzidos 1,5 ml de soro fisiológico na cavidade abdominal (Figura 10), massageando-se o abdômen do animal por 30 segundos para em seguida recuperar o máximo do líquido introduzido utilizando uma seringa de 3 mL. Esse material foi acondicionado em *eppendorf* devidamente identificado. Foi importante definir o volume recuperado com o auxílio da marcação de volume da seringa, conforme figura 11.

Fig. 10 – Introdução de 1,5 ml de soro fisiológico na cavidade peritoneal (CP)



Fonte: Arquivos do autor

Fig. 11 – Volume recuperado da CP



Fonte: Arquivos do autor

Realizou-se a contagem de células totais em 40 μ l da suspensão utilizando o contador automático de células (Hemocytometer). O próximo passo foi a realização da preparação do citoesfregaço (cytospin), como se observa na Figura 12. Foram preparadas duas lâminas por animal, acrescentando 60 μ L do lavado em cada caçapa do aparelho, centrifugando por 16 minutos a 500rpm em temperatura ambiente. A preparação da lâmina no aparelho seguiu a seguinte ordem: Lâmina (externamente) + papel filtro + acrílico (voltado para o centro do aparelho). Logo após o tempo decorrido foi retirada as lâminas, aguardando-as secar, realizando a coloração de *Wright*. Incubou-se a lâmina (coberta completamente) com o corante durante 4 minutos. Acrescentou-se água destilada aguardando o tempo de 12 minutos, lavando com água. No final, limpou-se, com o auxílio de uma gaze o verso da lâmina. Foi realizada a contagem diferencial de leucócitos utilizando um microscópio óptico em objetiva de imersão (aumento de 1000X), realizando a contagem de 100 células.

Fig. 12 – Preparação do citoesfregaço



Fonte: Arquivos do autor

6.8 OBTENÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

O animal foi sacrificado e pesado conforme observado na figura 13, tendo o baço removido e transferido para uma placa de petri de 35mm, onde foi medido, pesado e registrado o valor (Figuras 14 e 15).

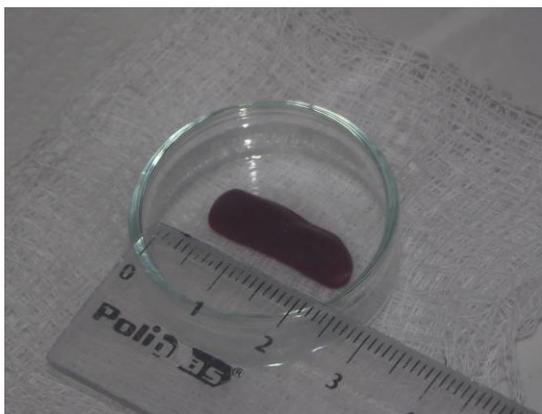
Fig.13 – Camundongo pesado para análise



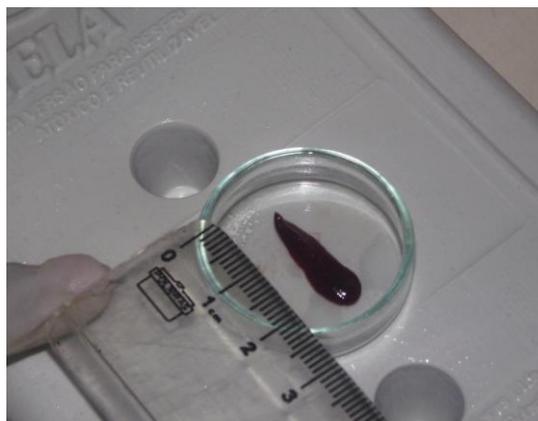
Fonte: Arquivos do autor

Foi determinado pesar 40mg do baço, para proceder a maceração, acrescentando 1mL da solução inibidora de proteases (Protease Inhibitor Cocktail - Sigma Aldrich), como visto na figura 16. O órgão foi macerado com o auxílio do embolo de uma seringa de 5 mL (Figura 17), o que gerou uma suspensão celular.

Fig. 14 – Baço retirado de camundongo KO-NO Fig. 15 – Baço de C57/Black 6 Selvagem



Fonte: Arquivos do autor



Fonte: Arquivos do autor

O material foi transferido para um *ependorf* devidamente identificado, onde este foi centrifugado a 450g, por 10 minutos, a 4°C. Resuspendeu-se as células em 3mL de soro fisiológico e procedeu a contagem total de células pelo contador automático CELM cc-530.

Fig.16– Diluição de parte do baço com soro fisiológico para preparo da maceração



Fonte: Arquivos do autor

Fig.17– Maceração: Obtenção de células esplênicas



Fonte: Arquivos do autor

Essas células foram ajustas para 500.000 células em 500 μ L em tubos de poliestireno, utilizados no citômetro de fluxo, onde foi acrescentado os anticorpos para a marcação de CD3, CD4 e CD8. A leitura dos experimentos foi realizada no citômetro de fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA).

6.9 ELISA INDIRETO PARA DOSAGEM DE IgG E SUBCLASSES

No teste de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), inicialmente sensibilizou-se a placa com 100 µl do antígeno (BHI) diluído 1:100 em tampão Carbonato Bicarbonato 0,5M pH 9,6 – deixando a 4°C “overnight” em câmara úmida. Em seguida, lavou-se rapidamente duas vezes com 200 µl/poço com o tampão de lavagem: solução salina tamponada com fosfato– 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Feito esse procedimento, realizou-se o bloqueio da placa adicionando 200 µl/poço de solução (leite desnatado) á 5% em PBS–T e incubou-se por 2 horas a 37°C. Logo após, descartou-se a solução de bloqueio.

Lavou-se rapidamente uma vez com o tampão de lavagem. Posteriormente foi adicionado 50 µl do soro diluído 1:100 em PBS -T , Molico 1% e incubou por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem, acrescentado 50 µl do conjugado anti-mouse marcado com peroxidase na diluição de 1:20.000 em PBS-T. A placa foi incubada 45 minutos a 37°C e posteriormente lavada novamente. Para finalizar adicionou-se 50 µl de solução reveladora TMB. Depois do teste concluído, incubou-se 15 minutos a temperatura ambiente e foi interrompida a reação com 25 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 4 N). Os resultados foram obtidos no fotolorímetro automático para leitura de ELISA com filtro 490nm.

6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

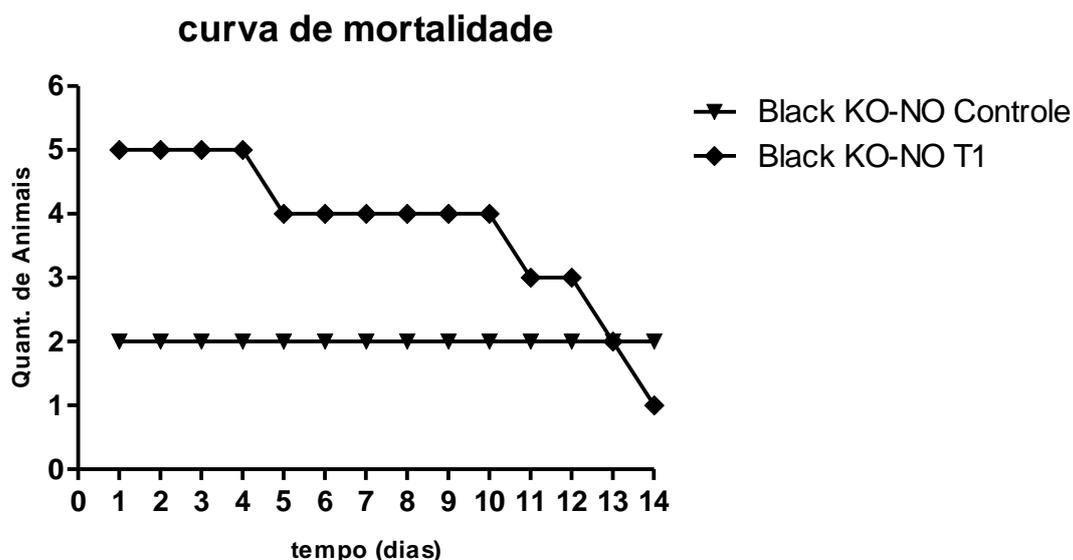
Para a análise estatística foi empregado a versão 15.0 do programa *Statistical Package for Social Sciences* - SPSS[®] realizando o teste não paramétrico Mann-Whitney para avaliar se houve diferença estatística entre os grupos, e o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* para verificar diferenças dentro do mesmo grupo. Para o desenho dos gráficos foi utilizado o programa *Graphpad prism 5*[®].

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 CURVA DE MORTALIDADE

No gráfico 1 encontram-se representados os valores da curva de mortalidade dos camundongos C57/Black 6 KO-NO com 14 dias de infecção. A mesma análise foi realizada com os camundongos C57/Black 6 selvagem, e não se verificou mortalidade em nenhum dos dois grupos (controle e infectado) no mesmo intervalo de tempo. Esses resultados dos camundongos selvagens, corroboram com estudo de Sacks; Noben-Trauth (2002), os quais afirmam que os animais C57/Black 6 têm sido vistos como resistentes à parasitas intracelulares, com a capacidade de gerar uma resposta imune de padrão Th1, capaz de estimular macrófagos, promovendo desta forma a eliminação dos parasitas intracelulares. No gráfico abaixo, observa-se que com quatro dias já houve perda nos animais KO-NO infectados com a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*. A partir dos dias 10, 11, 12 e 14 foi possível perceber no gráfico uma curva descendente até o dia do sacrifício. Trabalhos de Zahrt; Deretic (2002), com *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos C57/Black 6 tratados com inibidores da iNOS, mostram que a sobrevivência desses animais decaem de 120 para 34 dias, o que pode indicar os resultados achados nesse trabalho referente aos camundongos *Knockout*.

GRÁFICO 1- Curva de mortalidade



Determinação da curva de mortalidade de camundongos C57/Black 6 KO-NO, com 14 dias de infecção com 10^7 UFC por *C. pseudotuberculosis*.

A mortalidade entre os animais C57/Black 6 selvagens e KO-NO que receberam a mesma concentração bacteriana de 10^7 unidades formadoras de colônias, provavelmente está relacionado a ausência do NO. A concentração bacteriana foi determinada a partir de experimentos realizados por Vale (2005), demonstrando que essa dose foi capaz de ativar componentes da resposta humoral e celular em modelo murino Balb/C. A mesma bactéria T1 em animais CBA utilizando a dose de 10^2 não foi capaz de estimular uma resposta imune (COSTA SILVA, 2010).

Essas mortes podem indicar o que Hibbs et al. (1988) afirmaram que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas. Como esses animais não tinham produção, estavam mais susceptíveis para a infecção. Outro fato importante é que o IFN- γ acentua a função microbicida de macrófagos mediante a estimulação da síntese de intermediário reativos de oxigênio e NO (CHARO; RANSOHOFF, 2006). Como os animais *Knockout* não possuem a iNOS, enzima responsável pela produção de NO, a presença do IFN- γ , provavelmente não é capaz de estimular esses macrófagos, o que pode estar relacionado a mortalidade observada. Esses resultados corroboram com os de Borges et al. (2009), onde eles afirmam que a deficiência na enzima iNOS faz com que camundongos *Knockout* apresentem elevada susceptibilidade a infecção, mostrando que o NO constitui uma importante molécula microbicida.

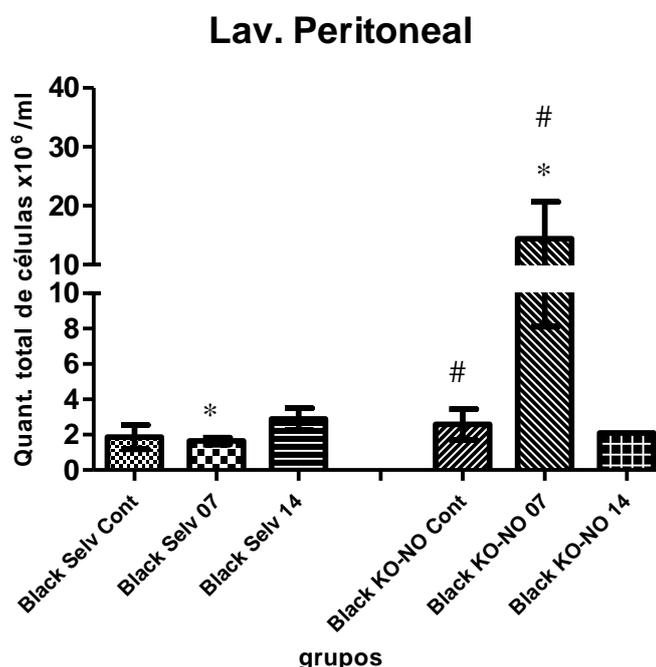
7.2 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS DO LAVADO PERITONEAL

No gráfico 2 encontram-se representados os dados da quantificação da celularidade total no lavado peritoneal de camundongos C57/Black 6 selvagem e KO-NO infectados por *C. pseudotuberculosis* (grupo controle, sete e 14 dias de infecção), com valores discriminados em $\times 10^6$. Observa-se médias quantitativas de células de 1,865; 1,640 e 2,886 respectivamente para os animais selvagens e 2,577; 14,388 e 9,85 para os animais KO-NO. A quantificação foi determinada pelo contador automático de células CELM cc-530.

Devido aos dados não apresentarem uma distribuição normal foi realizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney* para avaliar se houve diferença estatística

entre os grupos selvagem e KO-NO quanto a quantidade de células do lavado peritoneal. Verifica-se uma diferença entre grupos selvagem e KO-NO com sete dias de infecção, ($p = 0,009$), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos infectados com 14 dias. Observa-se também um aumento dentro do grupo *Knockout* entre o controle e a infecção com 07 dias com ($p = 0,053$), não havendo diferença estatisticamente significativa.

GRÁFICO 2 – Quantificação de células totais do Lavado peritoneal



Células aspiradas de camundongos C57/Black 6 selvagens e KO-NO com soro fisiológico após infecção por *C. pseudotuberculosis* e processadas pelo contador automático de células CELM cc-530

O mecanismo de virulência da *C. pseudotuberculosis* baseia-se na presença de antígenos de superfícies (somático) e antígenos secretados como a PLD. Esse mecanismo, segundo Vale (2005), para ser combatido pelo sistema imune, baseando-se na premissa de que a resposta imune celular do tipo Th1 é a resposta necessária para controlar a infecção e eliminar este patógeno. Desta forma, os resultados obtidos por esta autora demonstraram a existência, nos diferentes antígenos, de moléculas capazes de induzir *in vitro* citocinas e subclasses de anticorpos típicos da resposta Th1 e em menor intensidade da resposta Th2.

Esses antígenos são responsáveis pelo estabelecimento de um processo inflamatório e culminam na atração e ativação de células de defesa, principalmente células fagocitárias, para o sítio da infecção, o que corrobora com os experimentos de Mitchell et al (2006) no qual foi observado que os leucócitos migram através de junções interendoteliais e se dirigem aos sítios de inflamação guiados pelos fatores quimiotáticos.

O aumento no número de células no sítio de infecção é um mecanismo importante para eliminação dos patógenos invasores, principalmente a fagocitose realizada por macrófagos e neutrófilos, que são a primeira linha de defesa do organismo, relacionado-se desta forma com a resposta imune inata. Além disso, essas células são responsáveis pela produção e liberação no meio de NO e intermediários reativos do oxigênio (ROS), que irão auxiliar na citotoxicidade (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Pelos dados apresentados acima, observa-se que os animais C57/Black 6 selvagens infectados mantêm uma regularidade na quantidade de células na cavidade peritoneal. Não apresentam diferença entre os pontos analisados, sugerindo que as células da resposta imune presentes naturalmente nesta região como macrófagos, linfócitos B1 e mastócitos não necessitam de uma maior demanda das células sanguíneas para conseguir resolver ou conter o início da infecção.

Entretanto, ao avaliarmos os KO-NO infectados com a linhagem T1, verificamos uma necessidade maior de auxílio para conter a infecção, provavelmente ligado a ausência da produção de NO que dificulta a ação de células fagocíticas, facilitando desta forma a sobrevivência, crescimento e disseminação bacteriana, justificando um suporte de células sanguíneas. Esses resultados estão de acordo com o proposto por Toledo et al. (2004) que afirma que animais com deficiência de NO induzível apresentam maior inflamação, provavelmente devido ao maior parasitismo tissular.

Isso é condizente com o tempo, pois a resposta inflamatória é uma das primeiras respostas imune que tem o intuito de salvaguardar a integridade do hospedeiro, além de impedir a disseminação do patógeno. Por isto o aumento aos sete dias e um decréscimo com o passar do tempo evidenciam que está ocorrendo uma resposta controle por parte do sistema imune, não sendo mais necessário um aumento no influxo celular para a região peritoneal. Estudos de Akira, Uematsu e Takeuchi (2006) demonstraram que neutrófilos e monócitos são recrutados do sangue para os locais de infecção por ligação a moléculas de adesão em células endoteliais e por quimioatraentes produzidos em resposta a infecção, o que é evidenciado nos resultados encontrados.

7.3 QUANTIFICAÇÃO DO DIFERENCIAL DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DO LAVADO PERITONEAL

No gráfico 3 estão representadas as células encontradas no diferencial leucocitário do lavado peritoneal. O gráfico 3A representa os valores absolutos de macrófagos encontrados nos animais C57/Black 6 selvagens e C57/Black 6 KO-NO infectados por *C. pseudotuberculosis* com 07 e 14 dias. Como observado no gráfico, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle do grupo selvagem e KO-NO. Entretanto observa-se com 07 dias de infecção diferença estatística ($p=0,021$), entre os animais selvagens e KO-NO, o que não é verificado com 14 dias.

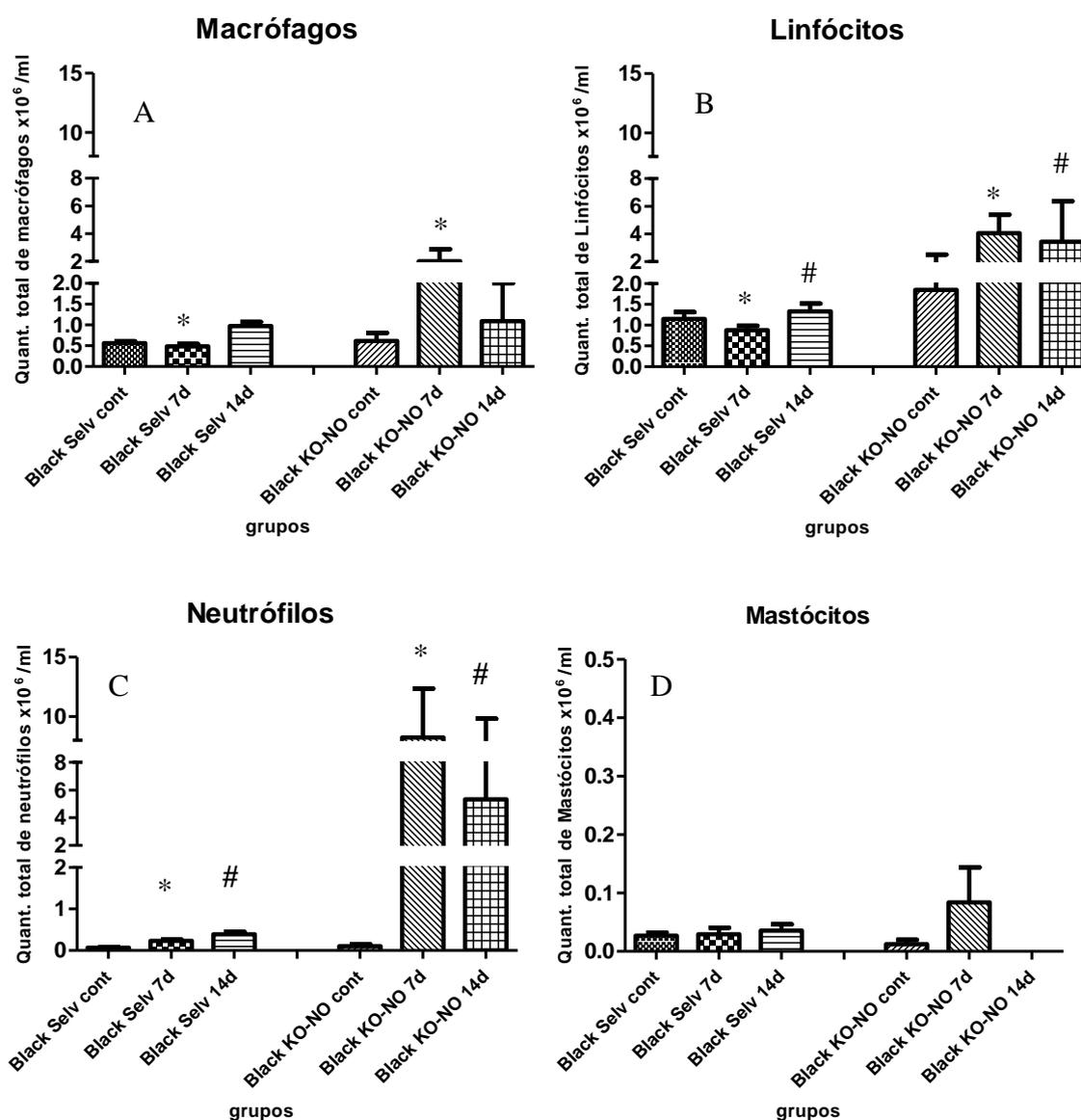
O gráfico 3B representa os valores absolutos de linfócitos encontrados nos animais C57/Black 6 selvagem e C57/Black 6 KO-NO infectados por *C. pseudotuberculosis* com 07 e 14 dias. Observa-se um p de 0,016 para 07 dias de infecção entre animais selvagens e KO-NO, mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre eles. Observa-se também um aumento celular com 14 dias de infecção dos animais *Knockout* em relação aos selvagens ($p=0,051$), porém sem haver diferença estatisticamente significativa entre eles.

No gráfico 3C abaixo, verifica-se a representação dos valores de neutrófilos encontrados nos animais selvagens e KO-NO infectados por *C.*

pseudotuberculosis com 07 e 14 dias. Nele percebe-se um p de 0,009 para 07 dias de infecção entre animais selvagens e KO-NO, expondo uma diferença estatística. Com 14 dias, não há diferença estatisticamente significativa ($p=0,051$), apesar de um aumento entre animais selvagens e KO-NO como visível no gráfico.

Com relação ao gráfico 3D, direcionados aos valores de mastócitos no diferencial da lavado peritoneal, não foi possível estabelecer uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos dos camundongos.

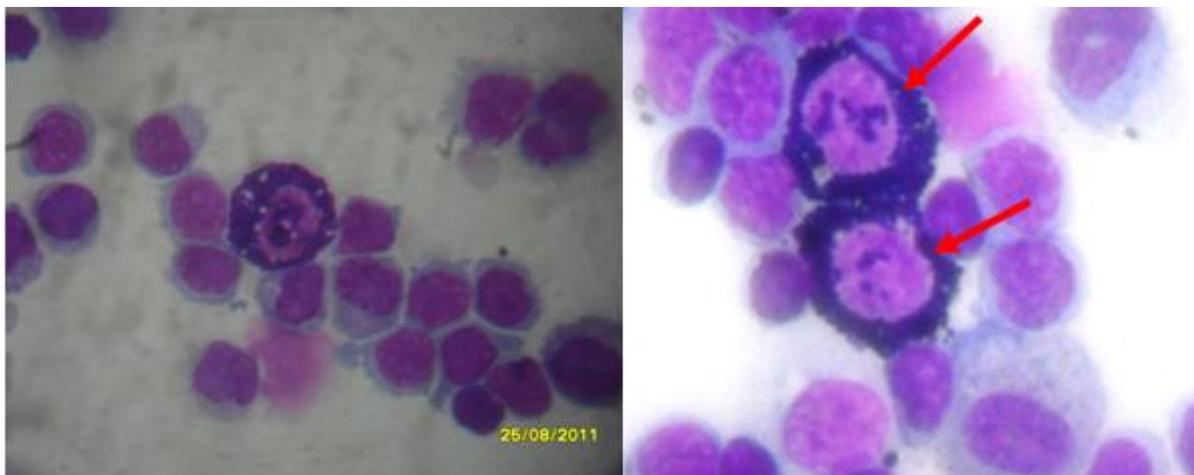
GRÁFICO 03 - Quantificação de células diferenciais do Lavado Peritoneal



Células aspiradas com soro fisiológico e processadas no cytopspin por 16 minutos a 500rpm, após infecção com sete e 14 dias por *C. pseudotuberculosis*. Contagem

diferencial com Wright em microscopia óptica em objetiva de 100X. (A) Macrófagos, (B) Linfócitos, (C) Neutrófilos e (D) Mastócitos.

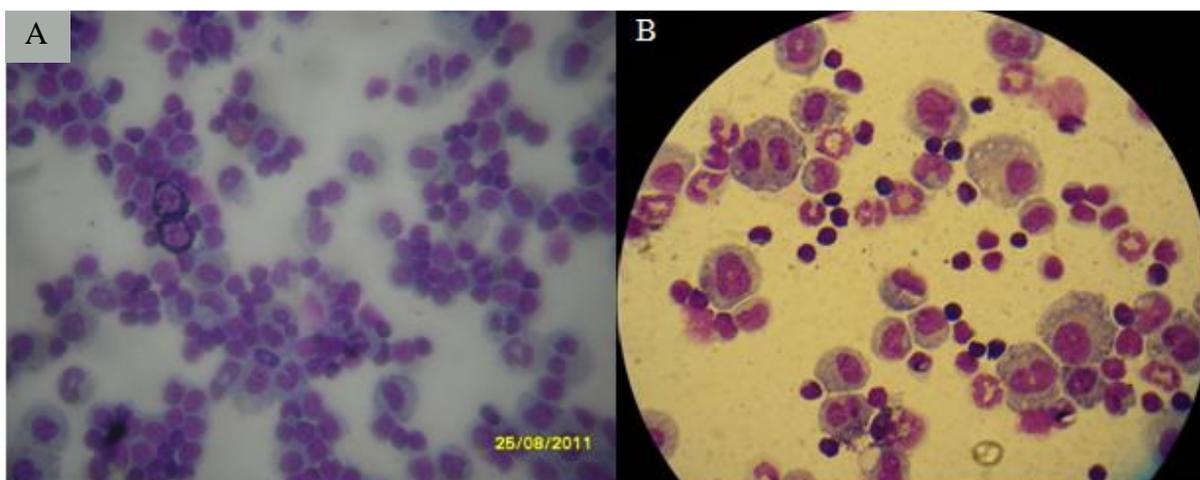
Fig. 18 - Mastócitos em esfregaço de camundongos infectados. Objetiva de 100x



Fonte: Arquivos do autor

O diferencial das células sanguíneas é um importante suporte para caracterizar alterações na concentração de determinados grupos de células que podem indicar como o sistema imune do indivíduo está atuando contra o patógeno. Ao avaliarmos o diferencial das células da cavidade peritoneal dos camundongos é possível perceber que as populações celulares dos animais C57/Black 6 Selvagem, não se alteram, corroborando com os dados já avaliados da quantidade total dessas células, demonstrando que possivelmente não se faz necessário uma grande variação do perfil das células nessa região.

Fig. 19 - Células do lavado peritoneal. (A) aspectos da celularidade (objetiva 10x), (B) Identificação de Linfócitos e Neutrófilos (Objetiva de 100x)



Fonte: Arquivos do autor

Ao analisarmos a presença de macrófagos nos animais *knockout* infectados, verifica-se um aumento considerável desta população. Isso também foi observado no trabalho de Mesquita et al. (2008), onde eles mostram que estas células são fagócitos eficientes, capazes de fagocitar patógenos atuando também como indutores da resposta adaptativa, pois após a fagocitose podem processar e apresentar antígenos via moléculas de MHC, estimulando assim a resposta mediada por células T, potencializando as respostas destas células, e das células B via expressão de moléculas co-estimulatórias e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL -1, IL-6, IL-12 e TNF- α . Como esses macrófagos não produzem NO, por se tratar de camundongos *Knockout*, eles apresentam dificuldade na eliminação do patógeno, necessitando de um aporte maior dessa população.

Em relação aos dados apresentados sobre a população linfocitária, demonstra-se um aumento principalmente nos animais C57/ Black 6 KO-NO infectados. Nessa região peritoneal, ocorre um aumento natural de uma população específica de linfócitos B, denominada de linfócitos B-1. Estas células, além de produzirem anticorpos da classe IgM, se comportam como uma célula aderente, quando ativado, agindo como uma potente célula fagocítica, apresentadora de antígeno. Estudos de Hardy et al. (1984), mostram que as células B-1, fornecem uma fonte de produção rápida de anticorpos contra microrganismos presentes em sítios particulares, como o peritônio. Esse aumento celular, mais uma vez, pode estar relacionado com a necessidade de suprir a ação fagocítica, uma vez que esses animais KO-NO não apresentam produção de NO, apresentando dificuldade na sua ação principalmente de macrófagos.

Os números de neutrófilos representados no gráfico em relação aos animais *Knockout* infectados apresentam um valor elevado. Isso pode ser condizente com o comportamento dessas células, pois são as de maior concentração no sangue, as primeiras a chegarem aos sítios de infecção, sendo importante no início da resposta inflamatória, como fica evidenciado no gráfico apresentado. Esses resultados estão condizentes com os estudos de Bilate (2007), os quais mostram que em estágios iniciais da inflamação o tipo celular predominante é o neutrófilo.

Em fases mais tardias monócitos e linfócitos também migram para o local, amplificando o processo inflamatório.

Dal secco et al (2002), mostram que dados da literatura sugerem que o NO apresenta um papel dual sobre a regulação da migração leucocitária em processos inflamatórios, pois em estudos anteriores, foi demonstrado que o NO é um mediador inibitório da migração de neutrófilos, ou seja, o NO inibe a adesão de neutrófilos ao endotélio, visto que os animais tratados com inibidores da NOS apresentaram potencialização da adesão leucocitária. Esses dados mostram que a ausência de NO nos camundongos C57/Black 6 podem aumentar a migração dessas células.

Já em relação aos mastócitos, estudos mostram que estas são células secretoras do sistema imune que participam da regulação da resposta imunológica, pela liberação de mediadores químicos, frente a um processo infeccioso (ZHAO et al., 2001). Em trabalhos de Norrby (2002), ele observa que em mamíferos, os mastócitos estão presentes no tecido conjuntivo, congregando assim um destacado padrão ao redor de pequenos vasos sanguíneos, vasos linfáticos, terminações nervosas. Verifica-se que os mastócitos expressam moléculas de superfície com atividade co-estimulatória ou co-inibitória, produzindo uma série de mediadores que podem direcionar as células dendríticas ou diferenciação e função das células T para o local da infecção (SAYED; BRONW, 2007). Na cavidade peritoneal foi esperada a presença de mastócitos, entretanto não foi encontrado nos tempos analisados (7 e 14 dias), nenhuma diferença estatisticamente significativa dessas células no experimento.

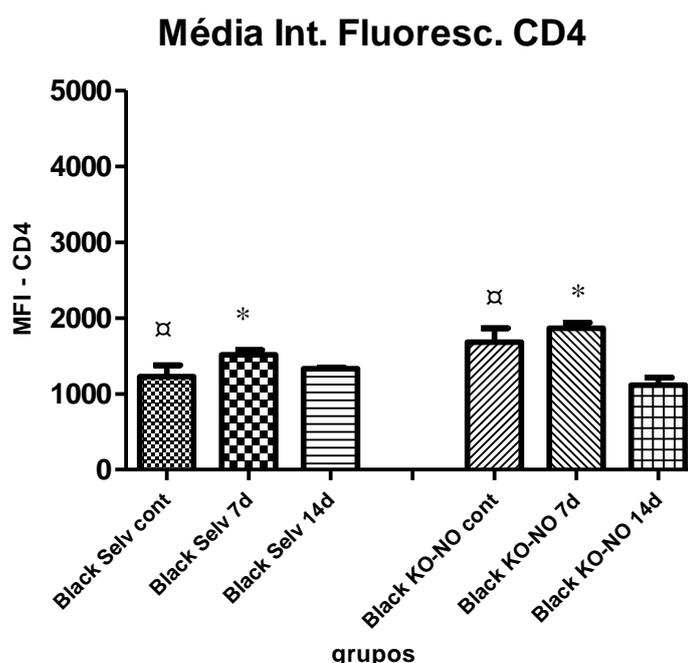
7.4 DETERMINAÇÃO DA MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DAS MOLÉCULAS CD4 E CD8

A análise da imunofenotipagem entre os grupos selvagens e KO-NO infectados por *C. pseudotuberculosis* verificando a média de intensidade de fluorescência é apresentado nos gráficos 4 e 5. No gráfico 4 estão representadas as células de

camundongos marcadas com anticorpos CD3/CD4, enquanto que o gráfico 5 representa as células marcadas com anticorpos CD3/CD8.

Na análise estatística para CD4 (gráfico 4), em relação aos grupos controles, dos animais selvagens e KO-NO, foi observado uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,021$) para o marcador CD4. Observa-se também uma diferença estatisticamente significativa com p de 0,009 aos 7 dias. Em relação aos 14 dias de infecção, não houve diferença estatística para células CD4 ($p=0,053$), apesar de ter havido um aumento entre os grupos selvagem e KO-NO infectados.

GRÁFICO 4 - Média de Intensidade de Fluorescência de Moléculas CD4

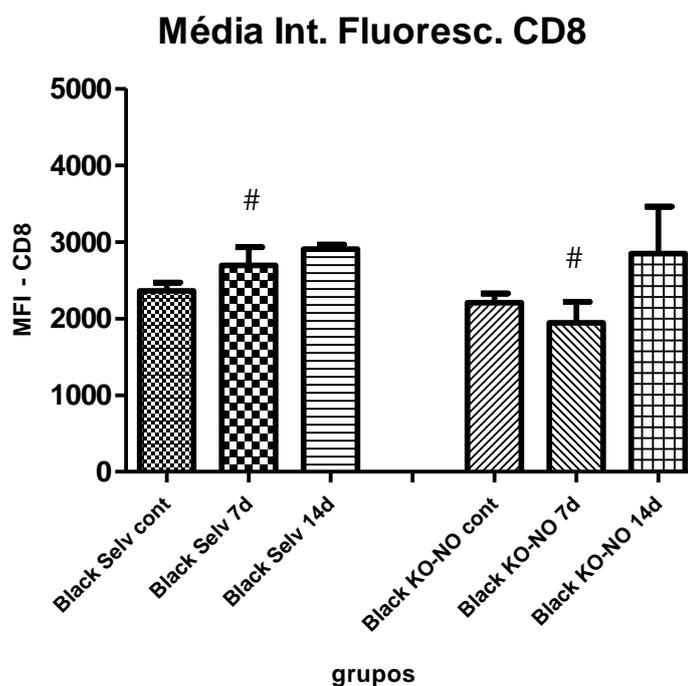


Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de moléculas CD4, do homogenato do baço, em camundongos C57/Black 6 selvagem e C57/Black 6 KO-NO infectados por *C. pseudotuberculosis* analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur. Os símbolos representam os valores com diferença estatística entre os grupos α p de 0,021, * p de 0,009.

Nos dados representados no gráfico 5 em relação ao MIF da molécula CD8 em relação aos grupos controles dos animais selvagens e KO-NO, não foi observado uma diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Porém em relação aos 7 dias de infecção se observa uma diferença estatisticamente

significante com um p de 0,047. Em relação ao grupo *Knockout* entre 07 e 14 dias de infecção, o gráfico não evidencia uma diferença estatística entre os tempos com ($p=0,053$), apesar da diferença entre os grupos observada.

GRÁFICO 5 - Média de Intensidade de Fluorescência de Moléculas CD8



Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de moléculas CD8, do homogenato do baço, em camundongos C57/Black 6 selvagem e C57/Black 6 KO-NO infectados por *C. pseudotuberculosis*, analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur. Os símbolos representam os valores com diferença estatística entre os grupos # p de 0,047.

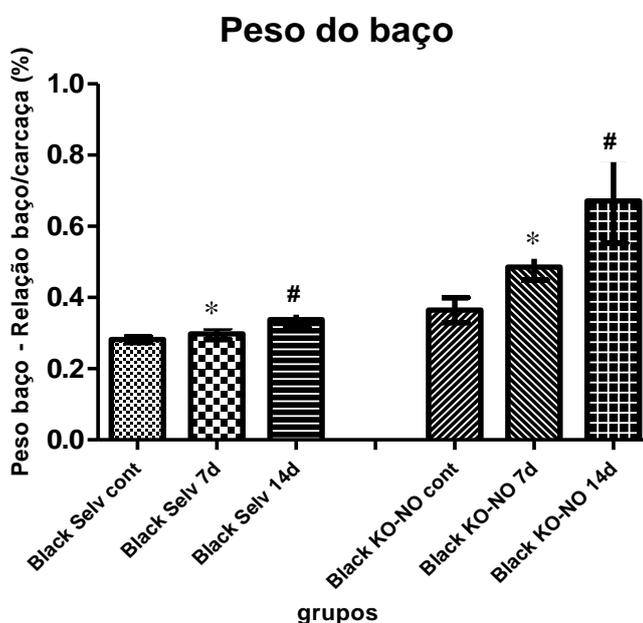
Ao analisarmos os dados é observado um aumento natural de linfócitos CD8 em relação ao CD4. A ativação de CD4 pode está relacionado a translocação bacteriana da sua zona de infecção, ou seja, região peritoneal, para a região sanguínea. O aumento na produção de linfócitos T CD8 combina com as características da bactéria, pois a mesma é intracelular facultativa, logo para seu controle torna-se necessário uma ativação dessas células, o que sugere uma provável resposta do perfil Th1. Os resultados apontam para uma inversão na relação CD4 – CD8, possivelmente para auxiliar a resposta para um perfil Th1, e com um período maior de exposição aumentando a expressão de CD8 possivelmente na ativação de células citotóxicas que irão destruir o patógeno.

Esses resultados estão de acordo com o estudo de Pépin et al (1994) no qual, observam que há mais linfócitos T CD8 em granulomas no sítio de inoculação, mostrando que essa população de linfócitos está relacionada com a atividade efetora e citotóxica, para conter a disseminação de macrófagos infectados.

7.5 DETERMINAÇÃO DO PESO DO BAÇO DE CAMUNDONGOS

Foi estabelecida no gráfico 8 a relação entre o peso da carcaça e o peso do baço retirado do mesmo camundongo logo após o sacrifício, representados entre os camundongos selvagens e KO-NO. As análises apontaram que os animais infectados com a linhagem T1 aos sete dias, apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) entre C57/Black 6 selvagem e KO-NO, ($p = 0,009$). Com 14 dias de infecção ficou demonstrado que os animais infectados por *C. pseudotuberculosis*, não apresentam diferença estatística entre C57/Black 6 selvagem e KO-NO, com ($p = 0,053$), mesmo havendo um aumento dos animais *Knockout* em relação aos selvagens.

GRÁFICO 6 – Comparação do peso do Baço de C57/Black6 selvagem e KO-NO



Determinação do peso do baço de camundongos C57/Black 6 selvagem e KO-NO infectados por *C. pseudotuberculosis*. Relação entre a carcaça do camundongo logo após o sacrifício e o baço retirado do animal. Animais infectados com 10^7 UFC.

O baço é um órgão linfóide secundário que possui células responsáveis pela eliminação dos patógenos presentes na circulação sanguínea. Entre estas células estão os macrófagos residentes. Nos trabalhos de Schwartz et al. (1982) observa-se que o baço desempenha um papel imune fundamental, especialmente quando microrganismos ou outros antígenos entram em contato com o hospedeiro diretamente por via intravenosa, visto sua função na recirculação linfocitária. Na ausência de NO, os patógenos chegam a corrente circulatória com mais facilidade, uma vez que os macrófagos estão defeituosos em relação ao mecanismo de eliminação destes, culminando com a chegada no baço, promovendo desta forma um possível comprometimento deste órgão na tentativa da eliminação da *C. pseudotuberculosis*. Este aumento é observado nos animais KO-NO que receberam 10^7 UFC, demonstrando que o aumento da quantidade bacteriana facilita a disseminação para a via hematológica.

7.6 DETERMINAÇÕES DA PRESENÇA DE GRANULOMAS

A tabela 1 determina a presença de granulomas nos animais C57/Black 6 selvagem e KO-NO aos 7 e 14 dias de infecção por *C. pseudotuberculosis*. Como observado abaixo os 14 animais selvagens, não apresentaram qualquer manifestação de presença de granulomas. Posteriormente, quando analisamos os animais C57/Black 6 KO-NO observamos uma mudança no cenário, pois dos 14 animais utilizados na eutanásia, incluindo os quatro controles, cinco apresentaram presença de granulomas, inclusive de formas múltiplas. A incidência recaiu nos animais *Knockout* infectados por *C. pseudotuberculosis* onde dos seis animais infectados restantes, cinco apresentaram granulomas.

Tabela 1 - Determinação da presença de granulomas

<i>Tempo</i>	<i>Black Selv</i> <i>Cont.</i>	<i>Black Selv</i> <i>T1</i>	<i>KO-NO</i> <i>Cont.</i>	<i>KO-NO</i> <i>T1</i>
7 dias	00/02	00/05	00/02	04/05
14 dias	00/02	00/05	00/02	01/01
Total	00/04	00/10	00/04	05/06

Fonte: Arquivo do autor

7.7 DETERMINAÇÃO DAS PRINCIPAIS REGIÕES ACOMETIDAS COM GRANULOMAS

Um panorama detalhado das principais regiões acometidas com granulomas é mostrado na tabela 2. Os dados abaixo representam o grupo de animais C57/Black 6 KO-NO nos tempos sete e 14 dias, infectados por *C. pseudotuberculosis*. Em alguns casos, houve animais com presença de mais um granuloma. Com sete dias de infecção é possível reconhecer o maior número de granulomas, devido ao número maior de animais, sendo estes encontrados nos linfonodos inguinais, cavidade peritoneal, fígado e diafragma com valores de 4, 2, 1, 1 respectivamente. Com 14 dias de infecção encontramos em um mesmo animal, três linfonodos com granuloma, sendo dois linfonodos inguinais e um entérico além de um granuloma na cavidade peritoneal.

Tabela 2 - Principais regiões acometidas com granulomas

Região Anatômica	KO-NO Controle	KO-NO (7dias)	KO-NO (14dias)
Linfonodo	00	04	03
Cav. Perit.	00	02	01
Fígado	00	01	00
Diafragma	00	01	00
Total	00	08	04

Fonte: Arquivo do autor

A fagocitose é uma ferramenta utilizada pelas células de resposta imune inata para eliminar patógenos invasores. Os macrófagos são células especializadas na realização da fagocitose e estes utilizam o NO como uma das ferramentas para eliminação do patógeno endocitado. Para a *C. pseudotuberculosis* quando esta invade o sistema respiratório são os macrófagos os responsáveis pela sua fagocitose.

Por ser um parasita intracelular e conseguir sobreviver dentro dos fagolisossomos, são estes macrófagos infectados responsáveis pela resposta granulomatosa e formação do material caseoso nos granulomas (GOMES, 2011). Como os animais utilizados neste experimento são KO-NO, estas células apresentam grande dificuldade na eliminação do patógeno intracelular. Por essa razão, ocorrerá uma maior disseminação dos microrganismos pela via linfática utilizada pelos macrófagos para apresentar ao centro germinativo dos linfonodos o material fagocitado nos tecidos acometidos. Esses resultados corroboram com os achados por Pépin et al (1991) onde demonstra que lesões piogranulomatosa precoces são formadas em linfonodos superficiais ou no local de inoculação.

7.8 DETERMINAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA POR *C. pseudotuberculosis*

Na tabela 3 encontra-se os dados referentes a disseminação bacteriana encontrada no linfonodo mesentérico. No grupo dos animais C57/Black 6 selvagem foi recuperado apenas um animal com 40 UFC, nos sete dias de infecção. No grupo dos animais KO-NO foram recuperados com sete dias de infecção, dois animais (95 e 185 UFC) ao passo que com 14 dias foi encontrado no único animal eutanasiado, 265 UFC infectado por *C. pseudotuberculosis*.

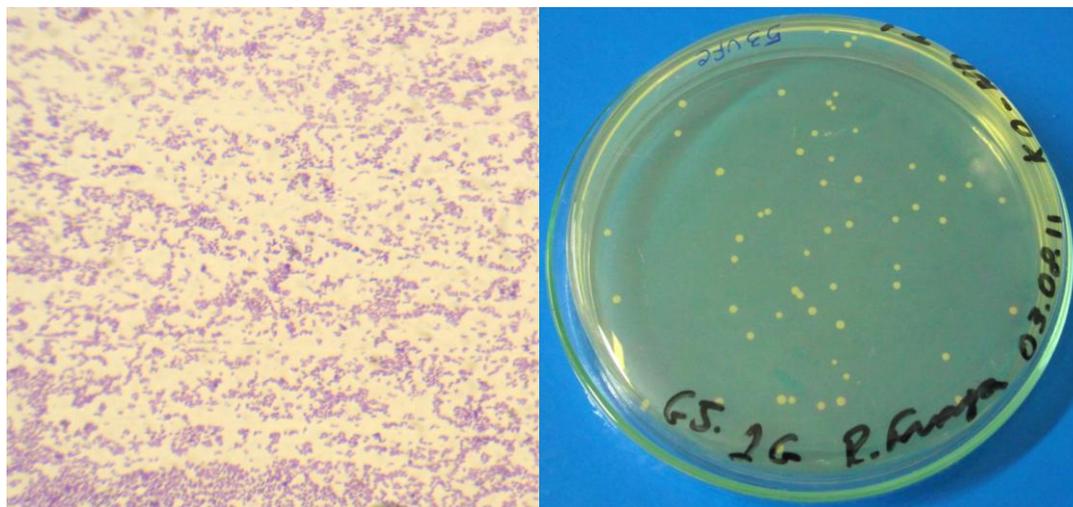
Tabela 3 - Determinação da disseminação bacteriana (UFC)

<i>Tempo</i>	<i>Black Selvagem Controle</i>	<i>Black Selvagem(T1)</i>	<i>KO-NO Controle</i>	<i>KO-NO (T1)</i>
7 dias	00/02	01/05	00/02	02/05
14 dias	00/02	00/05	00/02	01/01
Total	00/04	01/10	00/04	03/06

Fonte: Arquivo do autor

O sistema linfático é uma das principais vias de disseminação da *C. pseudotuberculosis*. Ao analisarmos um dos linfonodos drenantes da cavidade peritoneal (linfonodo mesentérico), foi possível detectar a presença e quantidade da bactéria, através da quantificação das unidades formadoras de colônia, principalmente nos animais KO-NO. Esses dados refletem o que Belchior et al. (2006) afirmam, que a disseminação do organismo do linfonodo regional para outros órgãos e tecidos, depende da virulência da linhagem e da carga bacteriana infectante.

Fig. 20 – (A) Microscopia óptica de coloração gram-positiva para *C. pseudotuberculosis*. Objetiva de 100x (B) Recuperação de *C. pseudotuberculosis* do linfonodo mesentérico de



Fonte: Arquivos do autor

Esse aumento do número de colônias recuperadas nos animais KO-NO sugere o aumento da disseminação desta bactéria, como visto em relação a quantidade de granulomas observados nesses animais. Essa distribuição pode referir-se a ausência de NO, pois os macrófagos que chegam aos linfonodos mantêm as bactérias viáveis, auxiliando no mecanismo de disseminação desse patógeno. Esses resultados estão de acordo com trabalhos de Cooper (2009) no qual demonstra que *Mycobacterium tuberculosis* é detectado no linfonodo de drenagem do pulmão 8-9 dias pós infecção

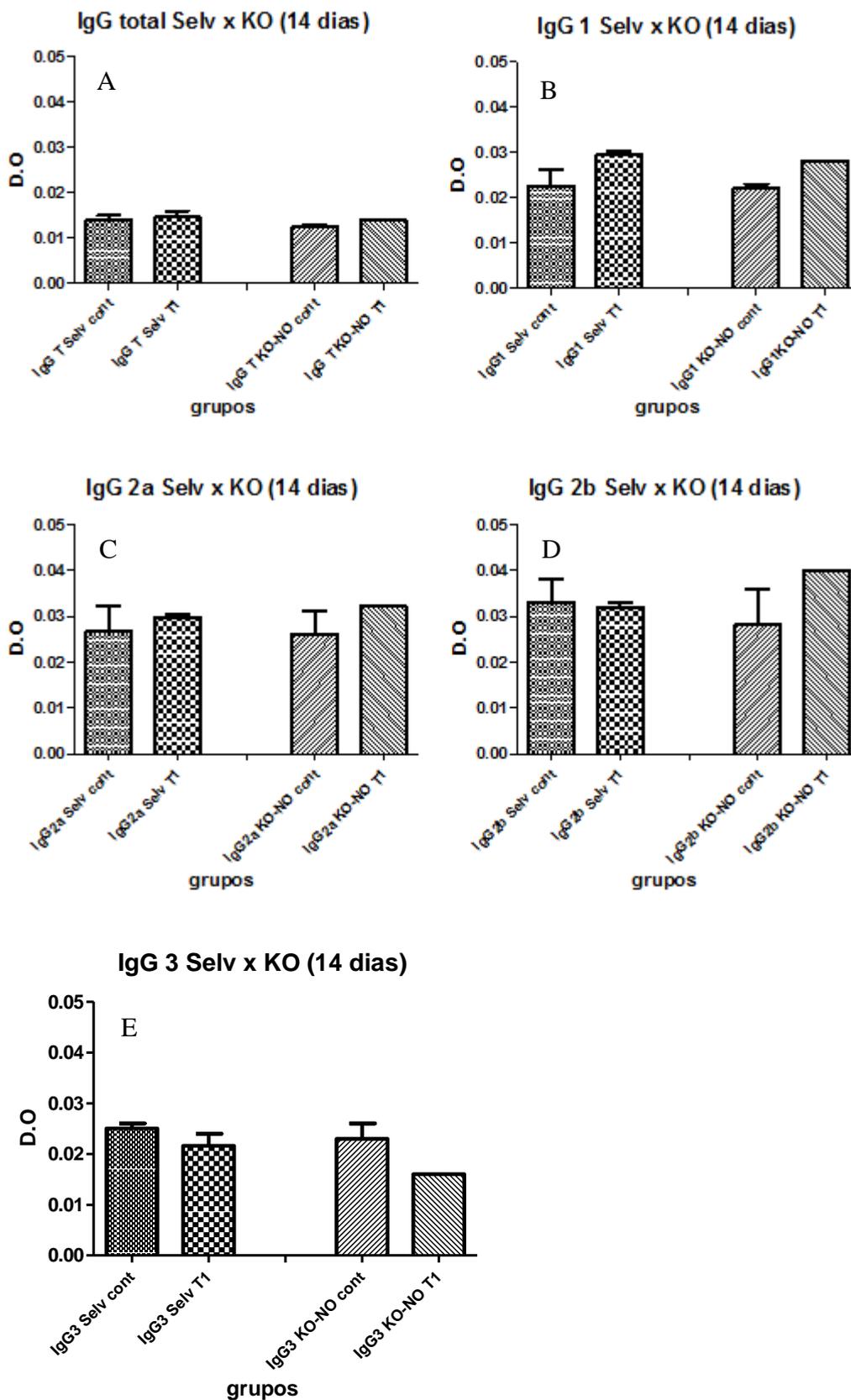
7.9 DETECÇÃO DE IgG TOTAL E DE SUBCLASSES (IgG1, IgG2a, IgG2b E IgG3) ATRAVÉS DE ELISA INDIRETO

Os gráficos abaixo correspondem aos resultados para ELISA indireto de IgG total e subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e gG3 dos camundongos C57/Black 6 Selvagem e KO-NO, sacrificados com 14 dias de infecção. Após todas as análises pode ser verificado que não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as linhagens de camundongos. Os resultados das densidades óticas de IgG total (gráfico 7A), variaram de 0,010 á 0,019 o que é praticamente insignificante. Os resultados seguintes das subclasses, também não mostraram

grande produção de anticorpos, conseqüentemente, nenhuma diferença estatística como pode ser visto nos gráficos 7 (B, C, D, E).

No gráfico 7B para IgG 1 as densidades óticas dos animais selvagens e KO-NO apresentaram valores entre 0,019 e 0,033 e 0,021 e 0,027 respectivamente. A produção de anticorpos IgG 2a no gráfico 7C compreendeu D.Os entre 0,021 a 0,041 para o grupo selvagem e de 0,021 a 0,069 para KO-NO. Os valores de IgG 2b evidenciou D.Os de 0,028 a 0,042 para o grupo selvagem e para o grupo KO-NO de 0,020 a 0,040. A produção de anticorpos IgG 3 no gráfico 7E para o grupo selvagem variou em D.O s de 0,016 a 0,030 enquanto que para o grupo KO-NO foi de 0,016 a 0,026.

GRÁFICO 7 - Detecção de IgG Total e Subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b E IgG3)



A resposta imune adaptativa tem início geralmente em torno do 14° ou 15° dia da infecção e intensifica-se com o passar do tempo. Avaliando a infecção por *C. pseudotuberculosis* em camundongos Balb/C infectados com 10^7 nos intervalos de 7, 30, 60 e 120 dias, Vale (2005), observou que os níveis de IgG3 não se alteram ao longo do tempo, enquanto que o IgG2a apresenta uma curva ascendente e aos 120 dias de imunização é a subclasse de IgG predominante. Percebe-se também um expressivo aumento do IgG1 nos quatro tempos, observando-se uma discreta elevação do IgG2b. No entanto, esse aumento só é considerável a partir dos 30 dias.

Paule et al (2003) em um estudo para avaliar as respostas imunes humoral e celular a partir de infecção experimental por *C.pseudotuberculosis* em caprinos, mostraram o envolvimento de IgG no processo. Nos grupos avaliados, estes apresentaram uma resposta primária de curta duração no dia 5 após a infecção, mudando o quadro a partir do 16° dia, com uma forte resposta secundária e de longa duração. Já Tatibana et al. (2007) em experimentos com camundongos ddY, observaram, uma resposta humoral apenas a partir dos 14 dias de infecção. Os resultados apresentados neste estudo, ao avaliar a resposta imune humoral com 14 dias, não foi detectou a presença de anticorpos consideráveis. Esta ausência pode está ligada ao curto espaço de tempo para o desenvolvimento de uma resposta humoral detectável para *C. pseudotuberculosis*, e este pode ser um dos motivos da grande disseminação das bactérias quando têm-se uma alteração no processo de fagocitose (animais KO-NO).

8 CONCLUSÃO

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

Animais C57/Black 6 KO-NO são susceptíveis à infecção por *C. pseudotuberculosis* com mortalidade observada a partir do 4º dia, o que indica a importância dessa molécula na defesa inata contra essa bactéria;

Observou-se a presença de linfócitos, com predomínio de TCD8, entre as células esplênicas de ambos os grupos, o que sugere a importância dessa sub-população na resposta imune contra esse microorganismo;

Os Neutrófilos foram as células encontradas em maior número no infiltrado peritoneal nos animais KO-NO, o que indica um mecanismo compensatório pela ausência do NO;

Verificou-se a maior presença de granulomas nos animais KO-NO infectados com 07 dias, sendo os linfonodos os mais afetados, o que aponta também para uma tentativa compensatória de conter a infecção;

Observou-se uma maior recuperação bacteriana nos camundongos KO-NO, provavelmente devido a sua maior capacidade de escape;

A produção de IgG e subclasses 14 dias pós infecção, tanto nos animais selvagens como nos KO-NO, foi similar aos animais controle, o que sugere uma resposta humoral tardia por esse tipo de anticorpo para esse microorganismo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. [S.l.]: W.B Saunders, 2000.
- ABBAS A. K.; LICHTMAN A. H. **Cellular and molecular immunology**. 6. ed. [S.l.]: Elsevier, 2006.
- ABBAS, A. K.; LINCHTMAN, A. H.; PROBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, 2008.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. **Linfadenite caseosa**: recomendações e medidas profiláticas. 2003. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/515379/1/COT33.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2011.
- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Vet. Not.**, n.5, p.69-75, 1999.
- ANDRADE, J. S. L. **Linfadenite caseosa em ovinos e caprinos criados nas micro-regiões de Piancó e Itaporanga/PB**: inquérito e fatores de risco associados à doença. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)–Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2007. Disponível em:< http://www.cstr.ufcg.edu.br/ppgmv/dissertacoes/dissert_jose_sostenes.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2011.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.
- ASHFAQ, M. K.; CAMPBELL, S. G. Experimentally induced caseous lymphadenitis in goats. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, p. 1789-1792, 1980.
- AUGUSTIN, J. L.; RENSHAW, W. H. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. **Am J Vet Res**. 1986 Apr;47(4):713-5.1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3963574>>. Acesso em: 16 jul. 2011.
- BARCELLOS, T. F. S.; SILVA, N.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Mamitecaprina em rebanhos próximos à Belo Horizonte/Minas Gerais. I-Etiologia e sensibilidade a antibióticos. II-Métodos de diagnóstico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**,v. 39, p.307-315, 1987.
- BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Aust. Vet. J.**, n. 63, p.269-272, 1986.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. C1424-1437, 1996.

- BELCHIOR, S. E. et al. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Rev. Vet. Argent.**, v. 23, p. 258-278, 2006.
- BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas Reumatol. Clin.**, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007. Disponível em: <www.cerir.org.br/pdf/TReuma2-07-Inflamação.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2011.
- BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES S. F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. **Can. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 46-49, 1987.
- BROGDEN, K. A. et al. Changes in ovine erythrocyte morphology due to sphingomyelin degradation by *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Microbiol. Pathog.**, v. 8, p. 157-162, 1990.
- BORGES, C. et al. Role of nitric oxide in the development of cardiac lesions during the acute phase of experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 2, p.170-174, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v42n2/v42n2a15.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2011.
- CARNE, H. R.; ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. **Nature**, v. 271, p. 246-248, 1978.
- CHARO I. F, RANSOHOFF R. M.. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 610-621, 2006.
- CHEVALLIER, N. et al. B-1 like cells exist in sheep: characterization of their phenotype and behavior. **Immunology**, v. 95, n. 2, p. 178-184, 1998.
- COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 393-422, 2009.
- COSTA SILVA, M. **Avaliação do efeito *in vitro* de frações de antígeno somático de *Corynebacterium pseudotuberculosis* sobre esplenócitos de camundongos da linhagem CBA.** 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.
- COUTINHO, A. A. A evolução da criação de caprinos e ovinos no Brasil. 2005. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/artigo/1092/a-evolucao-da-criacao-de-caprinos-e-ovinos-no-brasil>>. Acesso em: 17 dez. 2010.
- DAL SECCO, D. et al. Inibidores da síntese de óxido nítrico potencializam a adesão de neutrófilos. In: CONGRESSOS BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 34.; FARMACOLOGIA DA INFLAMAÇÃO E DA DOR, 2002, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, 2002. Abst. 04.067, p. 133. Disponível em:< <http://asp.sbftc.org.br/pub/media/Setor04.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2011.

- DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Vet. Res.**, v. 37, p. 201-218, 2006.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico, **J. Bras. Patol. Med Lab.**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n4/18548.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2011
- EHLERS, S. et al. $\alpha\beta$ T cell receptor: positive cells and interferon-g, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria- induced pulmonary immunopathology. **J. Exp. Med.** v. 194, p.1847-1859, 2001.
- ELLIS, T. M. 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.
- FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081-2095, 1989.
- GARCIA, M. et al. Isolamento e identificação do *Corynebacterium pseudotuberculosis* em ovinos e caprinos criados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo**, v. 24, n.1, p. 23-25, 1987.
- GOMES, M. J. P. **Gênero *Corynebacterium spp.*** Microbiologia Clínica Veterinária VET 3225, UFRGS, 2011. Disponível em: <www6.ufrgs.br/labacvet/files/Coryne-Rhodo-Arcano201102.pdf>. Acesso em: 06 ago. 2011.
- GREEN, S. J.; NACY, C. A.; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens. **J. Leuk. Biol.**, v. 50, p. 93-103, 1991. Disponível em: <www.jleukbio.org/content/50/1/93.full.pdf>. Acesso: 12 ago. 2011.
- GUIMARÃES, M. P. et al. Caracterização de alguns componentes celulares e físico-químicos do leite para diagnóstico da mamite caprina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 41, p.129-142, 1989.
- HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infect. Immun.**, v. 12, p. 1439-1449, 1975. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/12/6/1439>>. Acesso: 11 ago. 2011.
- HARDY, R. R. et al. Murine B cell differentiation lineages. **J. Exp. Med.**, v. 59, n. 4, p. 1169-1188, 1984. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/159/4/1169.full.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2011.

HIBBS, J. B. et al. L-arginine is required for the expression of the activated metabolic in target cells. **J. Immunol.**, v.138, p. 550-565, 1987.

HIBBS, J. B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.157, p. 87-94, 1988.

HESS, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/ type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J. Immunol**, v. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Efetivo nacional de bovinos cresce 1,5% em 2009**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1761&id_pagina=1>. Acesso em: 19 set. 2011.

IACOPUCCI, A. P. **Estudo do envolvimento dos receptores NMDA no colículo inferior sobre acatalepsia induzida pelo L-NOARG em ratos**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade do São Francisco, Bragança Paulista, 2010. Disponível em: <[http://www.usf.edu.br/braganca/mestrado/saude/uploadAddress/disserta%C3%A7ao_ana_paula_jacopucci\[14345\].pdf](http://www.usf.edu.br/braganca/mestrado/saude/uploadAddress/disserta%C3%A7ao_ana_paula_jacopucci[14345].pdf)>. Acesso em: 16 jul. 2011.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/content/59/4/533.full.pdf+html>>. Acesso em: 26 maio 2011.

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

LAN, D. T. B. et al. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma Interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 42, p. 863-870, 1998.

LEITE, E. R. **Ovinocaprinocultura no nordeste: organização e crescimento**. Disponível em: <http://www.nogueirafilho.com.br/arquivos_artigos/ovino-caprino-organizacao.htm>. Acesso em: 02 jun. 2011.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.**, v.79, n. 6, p. 647-664, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abd/v79n6/a02v79n6.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2011.

MAYER, G. **Imunidade inata (não específica)**. 2006. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter1.htm>>. Acesso em: 21 ago. 2011.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. **Bacteriología y virología veterinarias**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1975. p. 437-452.

- MESQUITA, J. R. et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Rev. Bras. Med.** 2008. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4053>. Acesso em: 13 out. 2011.
- MEYER, R. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: aspectos da prevalência, da imunidade e do imunodiagnóstico.** 2004. 141 f. Tese (Doutorado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.
- MEYER, R. et al. In vitro IFN-gama production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.107, p. 249-254, 2005.
- MITCHELL, R. N. et al. Inflamação aguda e crônica. In: ROBBINS; COTRAN. **Fundamentos de patologia.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 29-54,
- MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **J. Royal Soc. Med.**, v. 92, p.164-169, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1297136/pdf/jrsocmed00010-0012.pdf> >. Acesso em: 23 jun. 2011.
- MONCADA S.; PALMER R. M. J.; HIGGS E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. Pharmacol.** 38:1709–1715, 1989.
- MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Ann. Rev. Immunol.** v. 19, p. 683–765, 2001.
- MOURA-COSTA, L. F. et al. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 126, n. 1-2, p. 131-141, 2008.
- MOURA-COSTA, L.F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos **Rev. Cien. Med. Biol.** v.1, n.1, p.105-115, 2002.
- MUCKLE, C. A. et al. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet. Microbiol.**, v. 30, n. 1, p. 47-58,1992.
- NAIRN, M. E.; ROBERTSON, J. P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep: role of skin lesions and dipping fluid. **Aust. Vet. J.**, v. 50, n. 12, p. 537-542, 1974.
- NORRBY, K. Mast cells and angiogenesis. **APMIS**, v. 110, n. 5, p. 355-371, 2002.
- PAES-JORGE, K. C. **Efeito da suplementação nutricional com cogumelo *Agaricus blazei* sobre a infecção experimental murina com *Paracoccidioides brasiliensis*.** 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais)-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, 2010.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987

PAULE, B. J. A. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 96, p.129-139, 2003.

PÉPIN, M. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. **Vet. Microbiol.**, v. 26, p. 381-392, 1991.

PEPIN, M. et al. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **J. Leuk. Biol.**, v. 56, p. 666-670, 1994.

PÉPIN, M. et al. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet. Res.**, v. 28, p. 149-163, 1997.

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

PINHEIRO, R. R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.52, n. 5, p. 534-543, 2000.
Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000500021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 15 ago. 2011.

POLLOCK, J. S., et al. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and nateded bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 10480-10484, 1991.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52952/pdf/pnas01073-0115.pdf> >. Acesso em: 28 jul. 2011.

QUINN, P. J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. p.137-143.

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

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 845-858, 2002.

SAYED, B. A.; BROWN, M. A. Mast cell as modulators of T-cell responses. **Immunol. Rev.**, v. 217, p. 53-61, 2007.

SIMPLÍCIO, A. A et al. **Caprino-ovinocultura**: uma alternativa à geração de emprego e renda. 2006. Disponível em:

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/531307>>. Acesso em: 09 mar. 2010.

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

STHELING, J. M.; SOUZA, M. H. Leite de cabras: aspectos nutricionais e de mercado. **Inf. Agropec.**, v.13, p.54-55, 1987.

STUEHR, D. J. et al. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 7773-7777, 1991. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/88/17/7773.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 jul. 2011.

SCHWARTZ, P.E. et al. Postsplenectomy sepsis and mortality in adults. **JAMA**, v. 248, p. 2279-2283, 1982.

TATIBANA, B. T. et al..Resposta imune humoral na paracoccidiodomicose experimental em camundongos ddY. **Cienc. Agrar.**, v. 28, n. 2, p. 287-294, 2007.

TOLEDO, M. J. et al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **J. Antimicrobial Chemother.**, v. 53, p. 1045-1053, 2004.

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

UNANIAN, M. M.; SILVA, F. A. E. D.; PANT, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid Northeast. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, n.17, p.57-62,1985.

VALE,V. L. C. et al.. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados e imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Rev. Cienc. Med. Biol.**, v. 2, n. 2, p. 192-200, 2003.

VALE, V. L. C. **Avaliação de aspectos da resposta imune de camundongos contra *C. pseudotuberculosis***. 2005. Tese (Doutorado em Imunologia)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

VILHENA, F. S. D. S. **Mecanismo de nitrosilação de ferro-porfirinas por SNAP**: cinética de reação e estabilidade em ambiente aeróbico. 2006.161 f. Tese (Doutorado em Física)-Pontifícia Universidade Católica,Rio de Janeiro, 2006.

WANG Y.; MARDSEN, P.A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. **Curr. Opin Nephrol. Hypert.**, v. 4, p. 12-22, 1995.

WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. **Nature**, v. 4, n.8, p. 583-94, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2702150/pdf/nihms-117424.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2011.

ZAHRT, T. C.; DERETIC, V. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis*
Antioxid. Redox Signal, v. 4, n. 1, p. 141-159, 2002.

ZHAO, Z. Z. et al. Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. **Oral Dis.**, v. 7, p. 246-5, 2001.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



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



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 006/2010, intitulado “Avaliação de aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com cepa virulenta e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos”, sob a responsabilidade do Professor Roberto José Meyer do Nascimento, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em 12 de agosto de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 006/2010, entitled “Evaluation of aspects of host-parasite relationship during infection with virulent and attenuated *Corynebacterium pseudotuberculosis* in different strains of mice”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). This project was **APPROVED** by the Ethics Committee of Animal Use from the Institute of Health Sciences (CEUA-ICS, Federal University of Bahia - UFBA) on August 12, 2010.

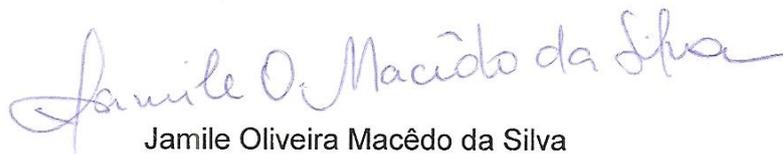
Salvador, 12 de agosto de 2010

Profª Dra. Songeli Menezes Freire
 Presidente da CEUA-ICS

ANEXO B – Declaração Revisão Ortográfica**ATESTADO DE REVISÃO ORTOGRÁFICA**

Eu, Jamile Oliveira Macêdo da Silva, atesto para os devidos fins, que realizei a Revisão Ortográfica baseada no Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa com base na Academia Brasileira de Letras (www.academia.org.br) na dissertação do mestrando Milton Galdino de Oliveira Neto, submetido ao Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - UFBA, com o título AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO DURANTE A INFECÇÃO POR *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM MODELO MURINO, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre sob a orientação do Prof. Dr. Roberto Meyer.

Salvador-BA, 12 de Dezembro de 2011



Jamile Oliveira Macêdo da Silva
CPF: 716.059.675-72
jamiletras2@hotmail.com / 75 8807-5748

ANEXO C - Declaração Revisão da Língua Inglesa

Núbia Guimarães
Revisão de Língua Inglesa
dubeiro.guimaraes@yahoo.com.br / 75 3684-2029

DECLARAÇÃO**REVISÃO LÍNGUA INGLESA**

Eu, Núbia Rosângela Guimarães Oliveira, graduada em Letras com habilitação em Inglês, declaro para os devidos fins, que realizei a Revisão da Língua Inglesa, da dissertação do mestrando Milton Galdino de Oliveira Neto, submetido ao Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - UFBA, com o título AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO DURANTE A INFECÇÃO POR *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM MODELO MURINO, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre sob a orientação do Prof. Dr. Roberto Meyer.

Salvador-BA, 13 de Dezembro de 2011.


Núbia Rosângela Guimarães Oliveira

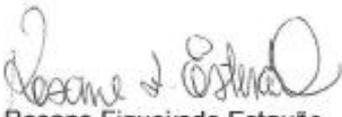
Matrícula: 11239113-3

CPF: 331.704.955-34

ANEXO D - Declaração Revisão Regras ABNT**DECLARAÇÃO****REVISÃO NORMAS ABNT**

Eu, *RCSANE FIGUEIREDO ESTEVÃO*, Bibliotecária CRB/5 -1623 atesto para os devidos fins que prestei serviços de revisão e adequação da norma ABNT NBR 6023:2002 - Referencias - Elaboração, o resultado de pesquisa do mestrando Milton Galdino de Oliveira Neto submetido ao Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - UFBA, com o título *AValiação da Influência do Óxido Nítrico Durante a Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM MCDELO MURINO*, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre sob a orientação do Prof. Dr. Roberto Meyer.

Salvador/BA, 12 de Janeiro de 2012.


Nome do responsável: Rosane Figueiredo Estevão

CPF: 520.435.179-53