



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



HEIDIANE ALVES DOS SANTOS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Avaliação da influência do interferon gama durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino**

SALVADOR - BAHIA  
2011



## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Avaliação da influência do interferon gama durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino**

**HEIDIANE ALVES DOS SANTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Imunologia.

**ORIENTADOR:**  
Prof. Dr. Roberto José Meyer do Nascimento

**SALVADOR - BAHIA**  
**2011**

**Sistema de Bibliotecas da UFBA**

Santos, Heidiane Alves dos.

Avaliação da influência do interferon gama durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino / Heidiane Alves dos Santos. - 2011.  
98 f. : il.

Inclui anexo e apêndices.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer do Nascimento.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2011.

1. Linfadenite caseosa. 2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 3. Interferon-gama  
I. Nascimento, Roberto José Meyer do. II. Vale, Vera Lúcia Costa. III. Universidade Federal  
da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde.

IV. Título.

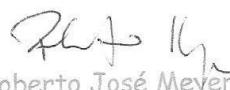


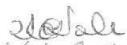
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



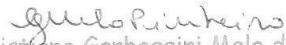
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO  
DA MESTRANDA HEIDIANE ALVES DOS SANTOS

Aos vinte e um dias do mês de dezembro do ano de dois mil e onze, às 09 horas no auditório Professora Ophélia Gaudenzi do Instituto de Ciências da Saúde, se reúne a Banca Examinadora composta dos Professores: Dr. Roberto José Meyer Nascimento Orientador, Dra. Vera Lúcia Costa Vale Co-Orientadora, Dra. Silvia Lima Costa ; Dra. Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro , com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "Avaliação da influência do interferon gama durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino" da Pós-graduanda HEIDIANE ALVES DOS SANTOS. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação aprovada, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, vinte e um de dezembro do ano de dois mil e onze.

  
Dr. Roberto José Meyer Nascimento  
Orientador

  
Dra. Vera Lúcia Costa Vale  
Co-Orientadora

  
Dra. Silvia Lima Costa  
Banca Examinadora

  
Dra. Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro  
Banca Examinadora

  
Profa. Dra. Silvia Lima Costa  
Vice-Cordenadora do PPGIm  
ICS - UFBA

  
Heidiane Alves dos Santos  
Mestranda

"Nas grandes batalhas da vida, o  
primeiro passo para a vitória é o  
desejo de vencer!"

(Mahatma Gandhi)

## AGRADECIMENTOS

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

À minha família base de tudo que sou hoje;

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

À minha irmã, Flávia e meus irmãos Fernando e Adson, que sempre me apoiaram e me ajudaram nos momentos mais difíceis e orgulharam-se de minhas vitórias;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Meyer, por quem tenho muito respeito e admiração, pelo empenho na idealização e realização desse trabalho.

À Profª Drª Vera Vale, pela pessoa especial que é, contribuindo brilhantemente para minha formação profissional e desenvolvimento científico, desde a minha graduação, transmitindo sabiamente seus ensinamentos;

À Profª Drª Soraya C. Trindade, pelo apoio, dedicação, extrema competência e valiosa contribuição para o desenvolvimento desse trabalho;

À Profª Drª Lilia Moura Costa, à mestrandra Priscilla Bogano e todo o Laboratório de Microbiologia da UFBA pelo apoio à realização deste trabalho;

Ao meu amigo e co-orientador Ricardo Fraga, companheiro de vários experimentos, pelo apoio nas horas difíceis e pelo exemplo a ser seguido;

Ao meu grande amigo (dupla) Milton Galdino, companheiro de todas as horas, pelo apoio fundamental à realização deste trabalho;

Aos colegas do Labimuno, Marcos, Geraldo, Andréia, Rosa, Rejane, Paulo, Gabi, Dani, Tadeu, Paty Cisneiros, Teka, Marivaldo, Igor, Bruna, Tati, pela pronta ajuda sempre que precisei;

Aos meus colegas de mestrado pelos agradáveis momentos em que estivemos juntos nesta caminhada;

Aos professores do PPGIm pelos importantes ensinamentos ministrados;

À Sra Dilcea, secretária do PPGIm, pela paciência em me atender sempre que precisei;

Aos funcionários do Labimuno, Dona Chica, Zé, Manoel, Lú, Mário, Rafa, Zilda pelo apoio e disponibilidade;

Aos estagiários de alunos de Iniciação Científica, Bárbara, Diego, Vitor, Bruno, Charles, Carlos e Ricardo por toda ajuda na realização deste trabalho;

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

À Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio.

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

## RESUMO

SANTOS, H. A. Avaliação da influência do interferon gama durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino. 98f. 2011. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, 2011.

A linfadenite caseosa é uma doença infecto-contagiosa crônica, de ocorrência mundial que acomete pequenos ruminantes, causando grandes perdas econômicas. Esta doença tem como agente etiológico a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e caracteriza-se pela formação de granulomas em gânglios linfáticos superficiais, podendo também acometer órgãos e linfonodos internos, como forma de resposta do sistema imune do hospedeiro à penetração deste agente que resiste a ação bactericida das células fagocíticas. Este patógeno se relaciona filogeneticamente ao *Mycobacterium tuberculosis*. A avaliação da resposta imune é uma importante ferramenta para localização de animais possivelmente infectados, dificultando desta forma a disseminação do agente. Estudos têm demonstrado a importância de citocinas na defesa de patógenos intracelulares facultativos, inclusive para *C. pseudotuberculosis*, destacando-se o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) citocina característica de células Th1, que pode estar envolvida na proteção à patógenos intracelulares. O presente estudo avaliou aspectos da resposta imunológica de camundongos da linhagem C57Black/6 selvagem e knockout para IFN-gama, durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Os grupos foram acompanhados ao longo de 7 e 14 dias após infecção intraperitoneal com  $10^7$  UFC, durante os quais foram avaliados a disseminação bacteriana, a frequência de granulomas, a variação de peso do baço, o padrão de migração celular para a cavidade peritoneal, além da resposta imune humoral através da dosagem de IgG e subclasses e resposta imune celular através da dosagem de citocinas e imunofenotipagem. Os camundongos knockout para IFN-gama se mostraram mais suscetíveis à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* apresentando maior disseminação bacteriana nos linfonodos mesentéricos, maior frequência de granulomas, aumento considerável no peso do baço, intensa migração celular para a cavidade peritoneal, principalmente neutrófilos e macrófagos e expressão de linfócitos T CD8+ nas células esplênicas, e consequentemente menor expressão de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias. Estes achados apontam para a importância do IFN- $\gamma$  na resposta imune a patógenos intracelulares a exemplo de *C. pseudotuberculosis*, ao tempo em que demonstra a resposta deficiente do sistema imune dos animais nocauteados à infecção.

PALAVRAS-CHAVE: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Linfadenite caseosa, Interferon-gama.

## ABSTRACT

SANTOS, H. A. Evaluation of the influence of interferon-gamma during infection by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a murine model. 98f. 2011. Dissertation (Master's degree in immunology) – Institute of Health Sciences, UFBA, Salvador, 2011.

The caseous lymphadenitis is a chronic infectious disease of worldwide occurrence that affects small ruminants, causing great economic losses to the. This disease has as its etiologic agent the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* and is characterized by the formation of granulomas in the superficial lymph nodes, which can also affect internal organs and lymph nodes, as a response of the host immune system to the penetration of this agent that resists the bactericidal action of phagocytic cells. This pathogen is phylogenetically related to *Mycobacterium tuberculosis*. The evaluation of the immune response is an important tool to identify possible infected animals, in this way, preventing the dissemination of the disease. Studies have shown the importance of cytokines in the defense of facultative intracellular pathogens, including *C. pseudotuberculosis*, especially interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) cytokines characteristic of Th1 cells, which can be involved in protection against intracellular pathogens. The present study evaluated the aspects of the immune response of mice of the strain C57Black/6 wild and *knockout* IFN-gamma during infection with *C. pseudotuberculosis*. The groups were followed over 7 and 14 days after intraperitoneal infection with  $10^7$  CFU, during which were evaluated bacterial dissemination, the frequency of abscess, the change in spleen weight, the pattern of cell migration into the peritoneal cavity, and humoral immune response by the dosage and subclasses of IgG and cellular immune response through dosage cytokine and immunophenotype. The *knockout* mice for IFN-gamma were more susceptible to infection by *C. pseudotuberculosis* with higher bacterial dissemination in mesenteric lymph nodes, increased frequency of granulomas, significant increase in spleen weight, intense cell migration into the peritoneal cavity, mainly neutrophils and macrophages and expression TCD8+ lymphocytes in spleen cells, and consequently lower expression of proinflammatory and regulatory cytokines. These findings highlight the importance of IFN- $\gamma$  in the immune response to intracellular pathogens like *C. pseudotuberculosis*, demonstrating the poor response of the immune system of animals *knocked out* the infection.

KEY-WORD: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Caseous lymphadenitis, Interferon-gamma.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 01	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (coloração Gram, crescimento em meio Agar BHI).....	19
Figura 02	Manifestações granulomatosas da linfadenite caseosa em caprinos.....	22
Figura 03	Esquema da estruturação de um granuloma.....	29
Figura 04	Esquema da evolução da patogenia da Linfadenite caseosa.....	32

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Efetivo mundial do rebanho de caprinos e ovinos.....	<b>24</b>
Tabela 2: Distribuição regional brasileira do efetivo do rebanho caprino.....	<b>25</b>
Tabela 3: Distribuição regional brasileira do efetivo do rebanho ovino.....	<b>25</b>

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcMO	Anticorpo monoclonal
BHI	Brain-heart Infusion
C	<i>Corynebacterium</i>
CD	“Cluster of Differentiation” – Diferenciação de Grupo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzime Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HCl	Ácido Clorídrico
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-27	Interleucina 27
kDa	Quilodalton
LC	Linfadenite Caseosa
LNM	Linfonodo mesentérico
LPS	Lipopolissacarídeo

LT	Linfócito T
KO	Camundongo <i>Knockout</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Média de intensidade de fluorescência
NFkB	Fator nuclear ativador da cadeia leve kappa de células B ativadas
Nm	Nanômetro
NK cell	Células <i>Natural Killer</i>
PBS	Tampão fostato com salina
PBS-T	Tampão fostato com salina e Tween 20 (detergente)
pH	Potencial hidrogeniônico
PLD	Fosfolipase D
PMN	Polimorfonucleares
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
RPM	Rotações por minuto
SPSS	“Statistical Package for Social Sciences” – Programa Estatístico para Ciências Sociais
LT CD4	Linfócito T expressando a molécula CD4 na superfície
LT CD8	Linfócito T expressando a molécula CD8 na superfície
LT $\gamma\delta$	Linfócito T expressando receptor heterodimérico $\gamma\delta$
TGF- $\beta$	Fator Transformador de Crescimento - $\beta$
Th1	Resposta imune celular com perfil 1
Th2	Resposta imune celular com perfil 2
Th17	Resposta imune celular com perfil 17
Th22	Resposta imune celular com perfil 22
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidades formadoras de colônia
WT	Camundongos “Wild type” (Tipo selvagem)

## SUMÁRIO

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.0</b>	<b>ESTADO DA ARTE.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.</b>	<b>HISTÓRICO E TAXONOMIA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO MICROORGANISMO.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>A LINFADENITE CASEOSA.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E ECONÔMICOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Distribuição geográfica e econômica.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>FONTES DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....</b>	<b>28</b>
<b>2.7</b>	<b>IMUNOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Imunidade contra <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>2.7.2</b>	<b>O papel do Interferon-gama (IFN-<math>\gamma</math>).....</b>	<b>38</b>
<b>3.0</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.0</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>MANUSCRITO.....</b>	<b>42</b>
<i>Avaliação da Influência do Interferon-Gama durante a Infecção por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em Modelo Murino.</i>		
<b>REFERÊNCIAS.....</b>		<b>82</b>
<b>APÊNDICES E ANEXOS.....</b>		<b>95</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>		<b>95</b>
<b>APÊNDICE B, C, D.....</b>		<b>96</b>
<b>APÊNDICE E, F.....</b>		<b>97</b>
<b>ANEXO A .....</b>		<b>98</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura é uma atividade rural de grande importância para o Brasil, principalmente para os pequenos e médios produtores da região Nordeste, particularmente da zona semi-árida, pois os rebanhos de pequenos ruminantes constituem as principais fontes econômicas e nutricionais dessa população (DORELLA *et al.*, 2006a; MEYER, 2004). Também exerce uma função social de elevada importância, devido à fixação do homem no campo, contribuindo, assim, para a diminuição do êxodo rural. Entre as doenças que acometem os rebanhos caprinos e ovinos nesta e em outras regiões brasileiras com alta prevalência (MEYER, 2004; SEYFFERT *et al.*, 2009), está a linfadenite caseosa, doença crônica infecciosa cujo agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacilo gram positivo, pleiomórfico, patógeno intracelular facultativo de fagócitos, relacionado filogenéticamente com *Mycobacterium tuberculosis* (DORELLA, 2006a; PASCUAL *et al.*, 1995).

A transmissão da doença acontece principalmente através da pele não íntegra, porém pode acontecer através do aleitamento por fêmeas doentes e pela eliminação de aerossóis contaminados. As manifestações desta doença, nos pequenos ruminantes, são caracterizadas principalmente por caseação necrótica dos linfonodos (MEYER *et al.*, 2005). Desta forma, a bactéria, ao adentrar no organismo é carreada para os linfonodos superficiais e drenantes, onde granulomas característicos são produzidos (BATEY, 1986b).

A imunidade a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, como em outros patógenos similares, tem sido atribuída a mecanismos básicos como o sistema imune inato e o adaptativo, este último sendo mediado tanto pela imunidade celular como pela imunidade humoral (LAN *et al.*, 1998). A fagocitose é a primeira linha de defesa e o principal mecanismo da imunidade natural (ou inata) contra bactérias intracelulares. A resistência à fagocitose e a digestão lisossomal, por sua vez, são mecanismos de escape deste tipo de agente, que podem levar à formação de lesões crônicas ou recidivantes (ABBAS *et al.*, 2008).

O sucesso na manutenção da infecção, por exemplo, em micobactérias, é dependente da capacidade do patógeno em evitar a indução de resposta microbicida pelo macrófago hospedeiro. A capacidade da micobactéria de causar níveis de infecção baixos, persistentes e latentes é consequência de algumas das estratégias empregadas para minimizar ou suprir o desenvolvimento de uma resposta imune (RUSSELL *et al.*, 1994).

Entretanto, por ser uma bactéria intracelular facultativa, a resposta mediada por células se constitui na principal arma do hospedeiro para combater a infecção (MEYER, *et al.*, 2005). Dessa forma, o perfil de células Th1 é o responsável pela indução da produção de citocinas essenciais para o controle da doença e estudos têm demonstrado a importância de citocinas na defesa de patógenos intracelulares facultativos, inclusive para *C. pseudotuberculosis* (LAN *et al.*, 1998, 1999; ELLIS *et al.*, 1991). A IL-12 é conhecida como uma citocina que induz a resposta do tipo Th1, estimulando a produção de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  por células CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$ , NK e macrófagos (TRINCHIERI, 1995). A IL-10 é outra citocina importante na regulação do sistema imune, pois bloqueia a ação ou produção de citocinas como a IL-12, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-4 e GM-CSF, e a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e MHC classe II, limitando assim a magnitude de ativação e efeito das citocinas liberadas por células T durante a resposta imune específica (PESTAKA *et al.*, 2004).

Neste contexto, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina que assume grande importância por promover a modulação da resposta imune pelo controle da expressão das moléculas de MHC classes I e II por diversos tipos de células, 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 óxido nítrico (NO), além de também ter a capacidade de regular a ativação e a diferenciação das células T CD4 $^{+}$ , o que torna esta citocina um componente chave no curso da resposta imune (BOEHM *et. al.* 1997; MEYER *et al.*, 2005; ABBAS, 2008). Adicionalmente, IFN- $\gamma$  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, 2001). Com isso, o uso de camundongos *Knockout* para interferon-gama nos possibilita uma análise comparativa da resposta imunológica diretamente relacionada às funções exercidas por esta citocina na infecção experimental destes animais por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Neste trabalho buscou-se avaliar e comparar aspectos da resposta imunológica de camundongos da linhagem C57Black/6 selvagem e *knockout* para IFN-gama, durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

A escolha do modelo murino utilizado neste trabalho se deve às inúmeras vantagens tais como o fácil manejo, a existência de linhagens isogênicas, a fácil obtenção de reagentes específicos para experimentos, e à possibilidade da utilização de animais *Knockout* para algumas citocinas relacionadas com a resposta imune, e sobretudo pelo fato destes animais

demonstrarem um padrão de resposta à doença imunologicamente semelhante ao observado com os caprinos e ovinos (VALE , 2005; CHORILLI *et al*, 2007; RODRIGUES *et al*, 2009).

## 2.0 ESTADO DA ARTE

### 2.1 HISTÓRICO E TAXONOMIA

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC), foi descrita pela primeira vez pelo veterinário francês, Edward Nocard, no ano de 1888, a partir de um caso de linfangite bovina (NOCARD, 1896). Três anos mais tarde, em Budapest, Hugo Von Preisz isolou uma bactéria similar a partir de um abscesso renal de uma ovelha, sendo o microrganismo denominado de “Bacilo de Preisz-Nocard” (COLLETT, BATH, CAMERON, 1994).

Novamente, em 1893, Nocard isolou o mesmo microorganismo a partir de uma enfermidade cutânea similar ao mormo em eqüinos (MERCHANT e PACKER, 1967). Preisz, em 1894, descreveu melhor o agente, comparando-o com o bacilo diftérico, denominando-o *Bacillus pseudotuberculosis ovis* (MERCHANT e PACKER, 1967; COLLETT, BATH, CAMERON, 1994). Em 1911, Buchanan sugeriu eliminar a designação da espécie, sendo denominado de *Bacillus pseudotuberculosis*. Em 1918, Eberson sugeriu classificá-lo como *Corynebacterium pseudotuberculosis* (ALVES e PINHEIRO, 1997; MERCHANT e PACKER, 1980).

A Sociedade Americana de Bacteriologia, no ano de 1923, passou a adotar a expressão *Corynebacterium* como nome do gênero, sendo o microrganismo renomeado *Corynebacterium ovis*. Sua nomenclatura atual foi adotada em 1948, na 6º edição do *Bergey's Manual*. No entanto, a designação *Corynebacterium ovis* ainda foi usada como sinônimo até por volta da década de 1980 (ALVES e PINHEIRO, 1997; BENHAM *et al.*, 1962; CORRÊA e CORRÊA, 1992; MERCHANT e PACKER, 1980).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* pertence à família *Corynebacteriaceae*, e juntamente com os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* está inserido no táxon *Mycolata* e na subordem *Corynebacterineae* (DOVER *et al.*, 2004; GARTY *et al.*, 2001). Os estudos de hibridização DNA-DNA e da seqüência do RNA ribossômico 16S, demonstram que *C. pseudotuberculosis* pertence ao mesmo grupo que *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* (TAKAHASHI *et al.*, 1997). Em 1971, Biberstein *et al.* sugeriram

a existência de dois biótipos de *C. pseudotuberculosis* baseados na capacidade em reduzir ou não nitrato em nitrito. Songer *et al.* (1988) confirmaram estes resultados, e propuseram os nomes de biótipo equi, nitrato redutase positivo, isolado de cavalos e bovinos, e biótipo ovis, nitrato redutase negativo, isolado de pequenos ruminantes e bovinos.

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DO MICROORGANISMO

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa, é uma bactéria Gram positiva, fermentativa, não esporulada, aeróbia facultativa e parasita intracelular facultativa de macrófagos (ANDERSON, RINGS, PUGH, 2005; KIMBERLING, 1988; MEYER *et al.*, 2002; PEKELDER, 2000; RADOSTITS *et al.*, 2002).

A palavra *corynebacterium* vem do grego (*koryne* = clava; *bakterion* = pequeno bastonete); pseudotuberculosis é derivado de *pseudo* = falso e *tubercle* significando o nódulo típico produzido pela infecção com *Mycobacterium tuberculosis* (COYLE e LIPSKY, 1990). A semelhança entre os granulomas causados pela infecção por *C. pseudotuberculosis* e os causados por *M. tuberculosis* é esperada devido à aproximação filogenética entre estes microrganismos (PASCUAL *et. al.*, 1995).

Este patógeno é caracterizado como bacilos curtos e irregulares e pleiomórficos, que varia desde a forma cocóide a bastões filamentosos, e mede aproximadamente entre 0,5 e 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro por 1,0 a 3,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, mostrando-se isolado ou formando grupamentos irregulares ou em paliçada (BENHAM *et al.*, 1962; MERCHANT e PACKER, 1975; BATEY, 1986b; QUINN *et al.*, 1994). Além disso, possui condições ótimas de crescimento a 37°C em pH entre 7.0 e 7.2 (BUXTON e FRASER, 1977; MERCHANT e PACKER, 1967). Tem um crescimento inicialmente espaçado na superfície do ágar e, posteriormente, se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme alaranjado. O crescimento em meio líquido desenvolve-se como depósitos granulares, com uma película na superfície (BUXTON e FRASER, 1977; MERCHANT e PACKER, 1967; MUCKLE e GYLES, 1982). (Figura 1)



**Figura 1-** *C. pseudotuberculosis* **A:** em cultura de linfonodo por coloração pelo método de Gram. **B:** crescimento bacteriano em placa contendo Agar BHI.  
Fonte: Arquivos do autor.

Examinando *C. pseudotuberculosis*, através de microscopia eletrônica, Hard (1969) observou que o microrganismo exibia uma estrutura similar às outras espécies do gênero, com relação à aparência de sua parede celular, membrana plasmática, material genético, matriz citoplasmática e complexidade dos sistemas de membrana intracitoplasmática. Sobretudo, uma importante característica encontrada foi uma camada densa, externa à parede celular, composta por lipídeos, e com base neste conteúdo lipídico, bactérias do gênero *Corynebacterium* são relacionadas a outras do gênero *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, formando o complexo “CMNR”, considerando que os representantes deste grupo possuem a parede celular rica em componentes lipídicos similares, sendo o ácido micólico, o melhor caracterizado dentre eles (BARKSDALE, 1981).

Os lipídeos associados à parede celular de *C. pseudotuberculosis* correspondem a 11,3% do peso seco da célula bacteriana e exercem um importante papel na virulência do microrganismo (IONEDA e SILVA, 1979; JOLLY, 1966).

Assim como outras corynebactérias, *C. pseudotuberculosis* é capaz de produzir uma potente exotoxina, primeiramente descrita por Carne (1940). Esta toxina é uma glicoproteína encontrada no citoplasma e, em menores quantidades, na parede celular bacteriana, sendo denominada fosfolipase D (PLD). Seu peso molecular varia de 14,5 a 31,0 kDa, e pode ser inativada pelo calor (60°C por 10 minutos, 37°C por 2 semanas ou 25°C por três meses), pela acidez (pH abaixo de 5), ou pela formalina (BERNHEIMER *et al.*, 1985; CARNE, 1940; ONON, 1979). Além disso, a PLD possui ação nas células endoteliais, causando hemólise, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e linfáticos facilitando desta maneira a invasão bacteriana (COLLETT, BATH, CAMERON, 1994; WILLIAMSON, 2001).

Sendo characteristicamente uma hemolisina a PLD possui ação necrosante, apresentando desta forma importância na patogenia da infecção, bem como também no

diagnóstico sorológico (PEKELDER, 2000). A produção da toxina varia entre as cepas de acordo com a patogenicidade (RADOSTITS *et al.*, 2002).

Outra característica desta bactéria é a presença de uma espessa camada lipídica que promove a proteção contra a digestão pelas enzimas celulares, o que proporciona a este agente um prolongado tempo de sobrevivência (PEKELDER, 2000; WILLIAMSON, 2001). Este agente é resistente à dessecção durante meses, permanecendo vivo na carne congelada, fezes, exudato purulento, solo locais úmidos e escuros, pele, vísceras infectadas e intestinos (ANDERSON, RINGS, PUGH, 2005; KIMBERLING, 1988; SOBRINHO, 2001).

*C. pseudotuberculosis* cresce bem em meios enriquecidos como ágar sangue, ágar BHI (infusão de cérebro e coração) ou caldo BHI, ou enriquecidos com soro animal ou proteínas vegetais. Uma melhora em seu crescimento é obtida através da adição de extrato de levedura, triptona ou lactoalbumina (CAMERON e SWART 1965). No ágar sangue, formam-se colônias pequenas de coloração branco-acinzentada, opacas e friáveis, após um período de 24 a 48 horas (BROWN, 1985). Após alguns dias de incubação, as colônias podem alcançar 3 mm de diâmetro, tornando-se amarelo-esbranquiçadas (QUINN *et al.*, 1994; MOURA-COSTA, 2002). Já em meio líquido, como o caldo BHI, ocorre formação de uma frágil película na superfície, com leve turvação do meio, que se desfaz sob agitação formando flocos. Esta película é atribuída aos lipídios de superfície e está diretamente relacionada à virulência da linhagem (CARNE, 1939; JOLLY, 1966; MERCHANT e PACKER, 1975; MOURA-COSTA, 2002; MUCKLE & GYLES, 1982).

Moura-Costa *et al.* (2002) descreveram um meio quimicamente definido para o cultivo da *C. pseudotuberculosis*, composto por 72% de fosfato dibásico, 4% de vitaminas e 1% de aminoácidos. Este meio foi usado para a produção de complexo antigênico secretado por *C. pseudotuberculosis*, que mostrou ser capaz de induzir a produção de Interferongama (IFN-gama) por células do sangue periférico de caprinos com sinais clínicos da LC (REGIS, 2001). Livre de macromoléculas na sua composição, o meio quimicamente definido permitiu a obtenção de complexos antigênicos compostos apenas por proteínas da bactéria e abriu novas perspectivas para o estudo das proteínas secretadas (MOURA-COSTA *et al.*, 2002).

Algumas características bioquímicas foram propostas para identificar *C. pseudotuberculosis* dentro do grupo das corinebactérias: as atividades uréase e fosfolipase D positivas, próprias de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, a atividade pirazinamidase negativa, própria de *C. pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, e a atividade de fermentação do amido (BARKSDALE *et al.*, 1981; MUCKLE E GYLES, 1982). *C. pseudotuberculosis* também é caracterizado pela produção de catalase, redução de nitrato a

nitrito e fermentação de carboidratos como maltose, manose, glicose, sem produção de gás, algumas linhagens fermentam a galactose (MUCLKE e GYLES, 1982; SONGER *et. al.*, 1988). Esta porém, não tem atividade proteolítica, não hidrolisando a gelatina nem digerindo a caseína (MERCHANT & PACKER, 1975; QUINN *et al.*, 1994). Segundo Songer *et al.* (1988) a variabilidade nas características bioquímicas, particularmente quanto à fermentação de carboidratos, pode ser atribuída à existência de biotipos distintos entre as espécies bem como ao uso de diferentes métodos por diferentes pesquisadores.

Os padrões de susceptibilidade deste microrganismo a agentes antibacterianos é pouco variável entre linhagens e permite classificá-lo como sendo sensível *in vitro* às drogas anti-infecciosas comuns (ASHFAQ E CAMPBELL, 1980; ZHAO *et al.*, 1991). Geralmente, os antibióticos aos quais essa bactéria é sensível incluem tetraciclinas, gentamicina, penicilina, lincomicina entre outros. Todavia, *C. pseudotuberculosis* demonstrou resistência à estreptomicina (ASHFAQ e CAMPBELL, 1980; MUCKLE e GYLES, 1982; PEKELDER, 2000).

### 2.3 LINFADENITE CASEOSA

A linfadenite caseosa (LC) também conhecida como mal do caroço, ou ainda como falsa tuberculose é uma doença infecto-contagiosa crônica que tem a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* como agente etiológico e acomete principalmente pequenos ruminantes (caprinos e ovinos), que pode eventualmente causar linfagite ulcerativa em eqüinos e dermatite ulcerativa em bovinos, búfalos e cervos (BATEY, 1986a; BATTEY E TONGE, 1968; BENHAM *et al.*, 1962; CAMERON e MINNAR, 1969; LOPEZ *et al.*, 1966; ZAKI, 1976).

Relatos sobre o acometimento de humanos são raros, sendo que, os casos mais graves desenvolvem uma linfadenopatia localizada cujo tratamento consiste na excisão cirúrgica para retirar o linfonodo afetado, não havendo assim relatos de infecções fatais. Sobretudo, as infecções em humanos causadas por *C. psedutuberculosis*, na maioria dos casos tem sido associada à exposição ocupacional (contato direto com animais doentes ou a exposição a produtos animais contaminados) o que demonstra o potencial zoonótico da bactéria (PEEL *et al.*, 1997). Já ocorreram aproximadamente 25 casos de infecção em humanos com este microrganismo e a sintomatologia envolve tanto a linfadenite quanto a presença de abscessos nos nódulos linfáticos (LIU *et al.*, 2005; MILLS *et al.*, 1997; PEEL *et al.*, 1997). Nestes

casos, o tratamento apenas com antibióticos sistêmicos geralmente é ineficaz, sendo necessário também a excisão cirúrgica do linfonodo afetado (BAIRD e FONTAINE, 2007).

A doença é caracterizada por lesões caseosas purulentas (granulomas) nos gânglios linfáticos e ocasionalmente nos pulmões, baço, rins e fígado. (KIMBERLING, 1988; PEKELDER, 2000; SMITH e SHERMAN, 1994; SOBRINHO, 2001). Entretanto, esta pode se manifestar de duas formas: a LC externa ou superficial que é a forma clínica mais freqüente, caracteriza-se pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais, principalmente parotídeos, submandibulares, poplíteos, precrurais, supramamários e pré-escapulares e em tecidos subcutâneos; e a LC interna ou visceral, forma subclínica, onde os abscessos se desenvolvem em nódulos linfáticos mediastínicos e bronquiais, e em órgãos internos, como pulmões, rins, fígado e baço, porém deve-se salientar que estas formas podem ocorrer simultaneamente no mesmo animal (MERCHANT e PACKER, 1967; PIONTKOWSKI e SHIVVERS, 1998; SCOTT, 2007).

Quando a infecção afeta o sistema respiratório, os sinais clínicos incluem perda de peso, dispneia, taquipneia e tosse crônica, por isso acredita-se que o envolvimento interno contribua para as síndromes da “ovelha magra” e do “caprino definhado”, as quais se caracterizam pela perda crônica de peso, subfertilidade, queda na produção de leite e redução no número de nascimentos de cordeiros (BELKNAP, 2004). Em ovelhas, é comum a disseminação da infecção do linfonodo supramamário para o tecido mamário, acarretando uma redução na produção de leite (RADOSTITS *et al.*, 2002). No entanto, as infecções também podem ser assintomáticas, o que dificulta as análises epidemiológicas sobre a prevalência da doença (ARSENAULT *et al.*, 2003; BUXTON e FRASER, 1977; PATON *et al.*, 1994).



**Figura 2** - Manifestações granulomatosas da linfadenite caseosa em caprinos. **A:** Linfadenite caseosa externa, acometimento de linfonodos da região parotídea; **B:** Linfadenite caseosa interna, acometimento do baço; **C:** Drenagem de granuloma externo apresentando material necrótico (pus) caseoso.

Fonte: Cortesia de Moura Costa, 2007

## 2.4 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E ECONÔMICOS

### 2.4.1 Distribuição geográfica e prevalência

A linfadenite caseosa é uma enfermidade de importância mundial muito difundida, no entanto, devido ao fato de sua prevalência em pequenos ruminantes ser subestimada e subnotificada em vários países, esta consequentemente é pouco relatada na literatura (CETINKAYA *et al.*, 2002). A freqüência da enfermidade em cada região do país depende da densidade animal, do sistema de exploração e do manejo sanitário adotado (CUBERO *et al.*, 2002).

Esta enfermidade é prevalente em vários países de todos os continentes, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo descrita em todos os países que possuem significativa população de caprinos e ovinos (ANDERSON e NAIRN, 1984; PEKELDER, 2000). Assim sendo, destacam-se países como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, França, Itália, Argentina, Chile, Uruguai, Venezuela, Turquia, Cuba e Brasil (ARSENAULT *et al.*, 2003; CABRERA *et al.*, 2003; CHIRINO-ZARRAGA *et al.*, 2005; DORELLA *et al.*, 2006a; LITERAK *et al.*, 1999, RUIZ *et al.*, 1995; WILLIAMSON, 2001 ), sendo também relatada na Dinamarca (MOLLER *et al.*, 2000).

Benham *et al.* (1962) relacionam casos de LC com isolamento de *C.pseudotuberculosis* em países como Argentina, Chile, Uruguai, Canadá, França, Itália, Grã-Bretanha, União Soviética e Sudão, confirmando assim o comportamento cosmopolita deste microrganismo.

Em relação à distribuição mundial de caprinos e ovinos, a China é a detentora do maior rebanho de pequenos ruminantes do mundo, seguida pela Índia e pelo Sudão. O Brasil encontra-se em 15º lugar, totalizando um rebanho de, aproximadamente, 26.000.000 cabeças de caprinos e ovinos (FAO, 2008) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efetivo mundial do rebanho de caprinos e ovinos

Países	Nº de Cabeças
China	285.812.950
Índia	190.721.000
Sudão	94.200.000
Nigéria	87.674.700
Paquistão	83.853.000
Austrália	79.518.024
Irã	79.100.000
Bangladesh	58.044.000
Etiópia	46.901.442
Mongólia	38.331.700
Nova Zelândia	34.183.595
Reino Unido	33.226.000
África do Sul	31.973.912
Turquia	29.568.160
Brasil	26.000.000
Mundo	<b>1.940.080.777</b>

Fonte: Modificado de FAO (2008)

A LC ocorre em todas as raças em ambos os sexos em todas as estações do ano, sendo que nos rebanhos infectados a morbidade pode estar acima de 15%, sendo os animais entre 4 e 5 anos de idade os mais comumente afetados, podendo ocorrer sobretudo em animais com até 6 meses de vida (KIMBERLING, 1988; MEYER *et al.*, 2002; PEKELDER, 2000; RADOSTITS *et al.*, 2002). Entretanto, a prevalência da doença apresenta variações quando se analisa o fator hospedeiro, sendo maior em ovinos do que em caprinos. Contudo, nas duas espécies, a patologia é mais observada em animais adultos, o que reflete uma maior exposição aos fatores de risco (AL-RAWASHDEH *et al.*, 2000; RADOSTITS *et al.*, 2002).

A prevalência com o passar dos anos pode chegar a 50 %, sendo que nos rebanhos criados extensivamente a doença não excede 30 %, porém a frequência de ovinos infectados tem aumentado sensivelmente com o passar dos anos (PEKELDER, 2000).

Com o intuito de avaliar a sua distribuição e como forma de prever as perdas relacionadas à enfermidade, na exploração econômica destas espécies, estudos relacionados à prevalência e incidência da LC nos rebanhos mundiais de caprinos e ovinos têm sido realizados (RADOSTITS *et al.*, 2002). Entretanto, algumas dificuldades enfrentadas na realização deste tipo de estudo, como a forma subclínica de apresentação da doença e seu longo período de incubação, fazem com que esses dados ainda sejam escassos (BROWN, 1985).

No Brasil, estima-se que a maioria dos rebanhos esteja infectada e que a prevalência clínica possa atingir 30% dos animais (Faria *et al.*, 2004). Os estados da região Nordeste são

os mais afetados, por conta de possuírem a maior concentração de rebanhos do país, com aproximadamente 91% da população de caprinos e 56% da população ovinos nessa região (ALVES e PINHEIRO, 1997; IBGE, 2010; Ribeiro *et al.*, 2001). No estado de Minas Gerais (região Sudeste), que ainda possui um rebanho reduzido, mas que apresenta crescimento nas atividades de ovelha e caprinocultura, a LC tem sido observada com alta frequência, onde 84,3% dos produtores relataram ter problemas decorrentes da patologia (Faria *et al.*, 2004). (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2** - Distribuição regional brasileira do efetivo do rebanho caprino

	Nº Cabeças	% do Rebanho Total
Norte	164 047	1,76
Nordeste	8 458 578	90,83
Sudeste	233 407	2,51
Sul	343 325	3,69
Centro-Oeste	113 427	1,21
Brasil	9 312 784	100

Fonte: IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (2010)

**Tabela 3.** Distribuição regional brasileira do efetivo do rebanho ovinos

	Nº Cabeças	% do Rebanho Total
Norte	586 237	3,37
Nordeste	9 857 754	56,72
Sudeste	781 874	4,50
Sul	4 886 541	28,11
Centro-Oeste	1 268 175	7,30
Brasil	17 380 581	100

Fonte: IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (2010)

Um estudo de Moura-Costa *et al.* (1973) sobre a distribuição geográfica da LC nos rebanhos caprinos no Estado da Bahia relatou que a doença estava presente, particularmente, no Norte do Estado. Neste mesmo estado, através de um estudo sorológico foi demonstrada a

presença de anticorpos séricos contra *C. pseudotuberculosis* em 46,6% dos caprinos analisados (MEYER, 2004).

Em 1997, no Ceará após a coleta de 4712 soros de caprinos em 177 propriedades localizadas em diversos municípios deste estado, obteve-se uma soroprevalência de LC nos animais de 26,3% e para as propriedades de 84,5% (CARMO *et al.*, 2009).

No estado de Minas Gerais um estudo epidemiológico realizado com 642 amostras de soro ovino oriundas de diferentes propriedades do estado mostrou uma prevalência estimada de infecção nos animais avaliados de 70,9% e das propriedades infectadas de 95,9% (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Os maiores prejuízos causados pela LC na produção de caprinos e ovinos estão relacionados a alguns aspectos da patogenia da enfermidade. A forma visceral (abscessos nos órgãos internos) é responsável por significativa perda econômica na criação de caprinos e ovinos, devido à desvalorização do produto ocasionado pela redução no ganho de peso e da produção quantitativa e qualitativa de lã, além da redução na produção de leite em virtude da alta ocorrência de granulomas mamários, da queda da eficiência reprodutiva, da condenação de carcaças e, até mesmo da morte de animais (ALVES, 1988; BURRELL, 1981; KRISHNA *et al.*, 1977; PATON, 1997; PATON *et al.*, 1988).

Adicionalmente, a forma superficial (abscessos nos linfonodos periféricos) leva à formação de cicatrizes que desvalorizam a pele, podendo ainda interferir na execução das funções normais do animal como pastear, mastigar, regurgitar e amamentar as crias. Além disso, a venda de pele é uma importante fonte de renda para o pequeno produtor local e há relatos de que a presença de deformações superficiais poderia reduzir o valor mercadológico destas peles em até 40% (FIGUEIREDO *et. al.*, 1982).

## 2.5 FONTE DE INFECÇÃO E TRANSMISSÃO

Normalmente, o início do processo infeccioso ocorre por meio da pele ou ferimentos na membrana mucosa, seguida pela disseminação da bactéria para os linfonodos superficiais, que constituem a fonte primária de infecção da LC e que, por conseguinte se abscedam e se rompem, bem como nas secreções nasal e bucal dos animais com abscessos pulmonares, que drenam para a árvore brônquica (RADOSTITS *et al.*, 2002). Contudo, a principal fonte de infecção é o conteúdo dos abscessos que supuram e contaminam o meio ambiente (ANDERSON *et al.*, 2005).

Unanian *et al.* (1985) sugeriram que a infecção através da pele é importante, particularmente em caprinos do Nordeste do Brasil, devido ao tipo de vegetação predominante na região (caatinga), caracterizada por pequenas árvores contendo espinhos que podem causar ferimentos superficiais.

Porém, a porta de entrada e distribuição dos abscessos no corpo pode diferir entre caprinos e ovinos, por ocasião da tosquia e diferentes comportamentos relacionados a estas espécies (ASHFAQ e CAMPBELL, 1979; NAIRN e ROBERTSON, 1974; PATON *et al.*, 1995).

A disseminação da bactéria também pode atingir os órgãos viscerais, principalmente os pulmões, devido ao fato deste microrganismo ser capaz de penetrar nesse órgão através da inalação, ou seja, via aerossóis expelidos por um animal acometido por granulomas pulmonares (BATEY, 1986b; ELLIS *et al.*, 1987). A invasão de órgãos internos pode ocorrer também pela passagem na mucosa vaginal ou digestiva e ainda pela liberação do patógeno na corrente sanguínea. Todavia, a penetração do agente pela pele pode acontecer mesmo na ausência de lesões aparentes (PATON, 1997a). Segundo relatos de Aleman e Spier (2001); Yeruham *et al.* (1996), insetos como *Haematobia irritans*, *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans* e *Culicoides sp* estão relacionados à transmissão da LC, porém tal fato ainda não foi reproduzido experimentalmente.

O mecanismo de transmissão da LC se da por contato direto com secreções infectantes ou mediada por equipamentos de tosquia, instalações, fômites e líquidos de banhos de imersão contaminados com o agente, o solo, a vegetação, bem como as fezes de animais infectados (ANDERSON *et al.*, 2005; CARNE, 1939; NAIRN e ROBERTSON, 1974; RADOSTITIS *et al.*, 2002; SOBRINHO, 2001).

A inalação de material infectante (pus de abscesso) pode causar o desenvolvimento de abscessos nos pulmões ou pneumonia nos ovinos. Lesões nas tonsilas e nos linfonodos retrofaríngeos de um animal podem ser responsáveis pela infecção aerógena de outros animais que estiverem em contato. A ingestão de material infectante foi relatada como causa do desenvolvimento de abscessos mandibulares em caprinos (COLLETT *et al.*, 1994; WILLIAMSON, 2001).

Entretanto, a transmissão e a disseminação de *C. pseudotuberculosis* estão relacionadas com as condições ambientais encontradas nas criações dos animais (AUGUSTINE e RENSHAW, 1986; YERUHAM *et al.*, 2004). O agente etiológico da LC é resistente a temperaturas baixas e locais úmidos, podendo sobreviver sob estas condições por oito meses no solo, por quatro meses em galpões de tosquia e por dois meses em feno e

materiais contaminados (RADOSTITS *et al.*, 2002). A persistência deste microorganismo no ambiente parece ser o principal fator responsável pela sua transmissão no rebanho (AUGUSTINE e RENSHAW, 1986).

Desta forma, os métodos essenciais de disseminação entre animais estão relacionados a diversas práticas como: tosquia, tatuagem, marcação, castração, corte de cauda, vacinação, briga entre animais, contato com material purulento dos animais e das instalações, e compra de animais infectados ou em estado subclínico da doença. (ALVES e PINHEIRO, 1997).

Os fatores de risco relacionados à LC em ovinos incluem a raça (BRUERE e WEST, 1990; GUIMARÃES *et al.*, 2009), a idade avançada (GUIMARÃES *et al.*, 2009; PATON *et al.*, 1995; PÉPIN *et al.*, 1994) e a existência de um ambiente contaminado (BRUERE e WEST, 1990). Entretanto, o principal fator de risco identificado na Austrália e em vários outros países do mundo é a ocorrência de pequenas lesões na pele de ovinos em decorrência da tosquia (AL RAWASHDEH e AL QUDAH, 2000; SERIKAWA *et al.*, 1993).

## 2.6 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

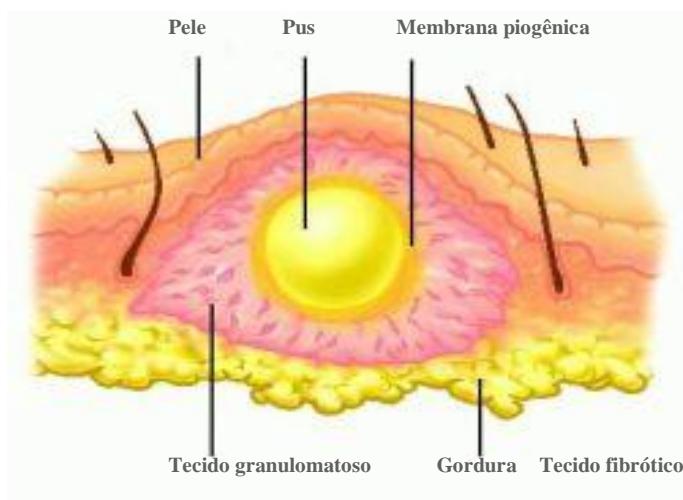
Após penetrar no hospedeiro, o microorganismo migra (a bactéria livre ou no interior de macrófagos) para a circulação linfática até um linfonodo onde a lesão pode se desenvolver (COLLETT, BATH, CAMERON, 1994). Desta maneira ocorre uma infiltração massiva de leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos para este local. Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo ocorre a formação de granulomas, inicialmente, micro abscessos na área cortical do linfonodo acometido, os quais aumentam de tamanho e juntam-se, formando um único abscesso central (PEKELDER, 2000; RADOSTITS *et al.*, 2002).

Progressivamente, as células epitelioides da lesão inicial são substituídas por uma necrose caseosa, sendo esta a característica predominante desta patologia. Esta massa caseosa vai sendo circundada por células epiteliais, linfócitos e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso; e à medida que a lesão progride, estas camadas celulares e fibróticas vão sofrendo necrose. Esse processo é crônico e se repete sucessivamente sobre a camada fibrosa, resultando no aspecto macroscópico desta patologia, o qual é caracterizado por uma massa esférica laminada, semelhante às camadas de uma cebola (JONES *et al.*, 2000).

O desenvolvimento subsequente da doença é devido à persistência e progresso da infecção, e envolve fagocitose, multiplicação intracelular do microorganismo e degeneração celular resultando em aumento do abscesso (PEKELDER, 2000). O período de incubação até

os abscessos serem notados nos linfonodos superficiais é de aproximadamente de 2 a 6 meses (SIMTH e SHERMAN, 1994; WILLIAMSON, 2001).

*C. pseudotuberculosis* é responsável pela formação de granuloma, o qual é formado por um centro necrótico contendo pus de cor verde claro a amarelo, cercado por camadas concêntricas de células do sistema imune (macrófagos, e principalmente, linfócitos), delimitadas por uma cápsula de tecido conjuntivo (figura 3). A consistência do pus evolui de líquida, no início da formação do granuloma, a pastosa, chegando a caseosa nas lesões antigas (PEPIN *et al.* 1994).



**Figura 3** - Esquema da estruturação de um granuloma.

Fonte: Modificado de <http://img.tfd.com/dorland/thumbs/abscess.jpg>

O piogranuloma na linfadenite caseosa consiste em um mecanismo de defesa, que limita a disseminação bacteriana sistêmica (PEKELDER, 2000). Em alguns animais a infecção pode se disseminar por via linfática e hematógena para os pulmões e outras partes do organismo sem envolver o linfonodo próximo da porta de entrada (COLLETT, BATH, CAMERON, 1994). Os abscessos pulmonares podem eventualmente romper e contaminar o meio ambiente (WILLIAMSON, 2001).

Estas lesões granulomatosas podem se manifestar tanto nos linfonodos superficiais, como em vísceras e em linfonodos internos. Outros sítios menos comuns, como úbere, bolsa escrotal e articulações, foram descritos (MENZIES, 1998). A localização dos granulomas depende, principalmente, da via de entrada do microrganismo, que por sua vez está diretamente relacionada ao sistema de manejo utilizado (VALE, 2005).

Todavia, embora a patogenia da linfadenite caseosa não esteja totalmente elucidada, três fatores foram amplamente descritos como sendo responsáveis pela virulência de *C.*

*pseudotuberculosis*: a fosfolipase D (PLD), a camada lipídica e uma proteína relacionada ao transporte de ferro produzida pelo gene Fag B.

A ação da PLD na disseminação do patógeno dentro do hospedeiro decorre do fato dessa exotoxina hidrolisar a esfingomielina, um componente importante da membrana, em colina e ceramida fosfato (CARNE e ONON, 1978). A colina é liberada enquanto a ceramida fosfato fica associada com a membrana comprometendo as células do epitélio vascular e aumentando a permeabilidade capilar (CARNE e ONON, 1978; MUCKLE e GYLES, 1983).

Estudos demonstraram destruição de neutrófilos após fagocitarem essa exotoxina, com isso garantindo a sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Em injeção intradérmica de PLD em camundongo foi observado a inibição da migração neutrofílica e uma formação de necrose no local (YOZWIAK e SONGER, 1993).

Yozwiak e Songer (1993) afirmam que a PLD D também atua na depleção do sistema do complemento, protegendo o microrganismo contra opsonização, além de reduzir a quimiotaxia de neutrófilos para o sítio inicial da infecção, evitando a fagocitose. Em um estudo conduzido por McNamara *et al.* (1994), linhagens mutantes com o gen da PLD deletado foram utilizadas para demonstrar que estes mutantes não são capazes de estabelecer uma infecção primária ou formar granulomas nos linfonodos regionais, confirmando que a exotoxina está envolvida na persistência e disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro.

A PLD demonstra ainda uma atividade hemolítica em sinergia com o colesterol-oxidase e a fosfolipase C de *Rhodococcus equi* (BURRELL, 1979; SONGER, 1997), e proporciona uma resistência à hemólise pela toxina  $\beta$  estafilocócica (SONGER et. al. 1988). Estas duas propriedades deram origem a dois testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-exotoxina (teste da inibição da ação anti- $\beta$ -hemolisina e teste da inibição da hemólise sinérgica) e do teste para a dosagem da exotoxina no sobrenadante de cultura (KNIGHT, 1978; ZAKI, 1968). Estas atividades enzimáticas foram relacionadas com a toxicidade da fosfolipase D em camundongo (SUTHERLAND *et al.*, 1989).

As atividades hemolítica, vasodilatadora e fosfolipásica da exotoxina são essenciais para a disseminação da bactéria no organismo animal (BATEY, 1986c; BENHAM *et al.*, 1962; BURRELL, 1981; JOLLY, 1966; SONGER, 1997).

A presença de lipídeos associados à parede celular bacteriana, além de atuar como fator piogênico, está relacionada ao aumento da virulência do microrganismo por impedir sua fagocitose pelas enzimas lisossômicas da célula hospedeira (JOLLY, 1966). A camada lipídica, presente na face externa da parede, assemelha-se em composição ao ácido micólico

encontrado no gênero *Mycobacterium* e sugere-se que tenha uma ação letal sobre os macrófagos (HARD, 1975). Essa camada impede a destruição do patógeno pelas enzimas lisossômicas permitindo com isso que, a bactéria sobreviva dentro do macrófago, como um parasita intracelular facultativo (BRAITHWAITE *et al.*, 1993; TASHJIAN e CAMPBELL, 1983).

Uma relação entre virulência e quantidade de lipídeos na parede de *C. pseudotuberculosis* foi evidenciada por infecções experimentais tanto em camundongos como em ovinos, mostrando que quanto maior o conteúdo lipídico maior a capacidade de formar granulomas (BURRELL, 1978; MUCKLE E GYLE, 1983). Outros autores acreditam que estes lipídeos estejam relacionados à citotoxicidade (BATEY, 1986c; SONGER *et al.*, 1990). Nos dois casos, foi observada uma alta relação entre o conteúdo lipídico das cepas testadas e sua capacidade de formar granulomas (WILLIAMSON, 2001).

Outros fatores de virulência veem sendo descritos em *C. pseudotuberculosis*, dentre os quais destacam-se os produtos dos genes *Fag A, B, C e D*, proteínas que retiram ferro do hospedeiro, transportando-o para a bactéria. Bactérias com mutações nestes genes mostraram diminuição da virulência (BILLINGTON *et al.*, 2002).

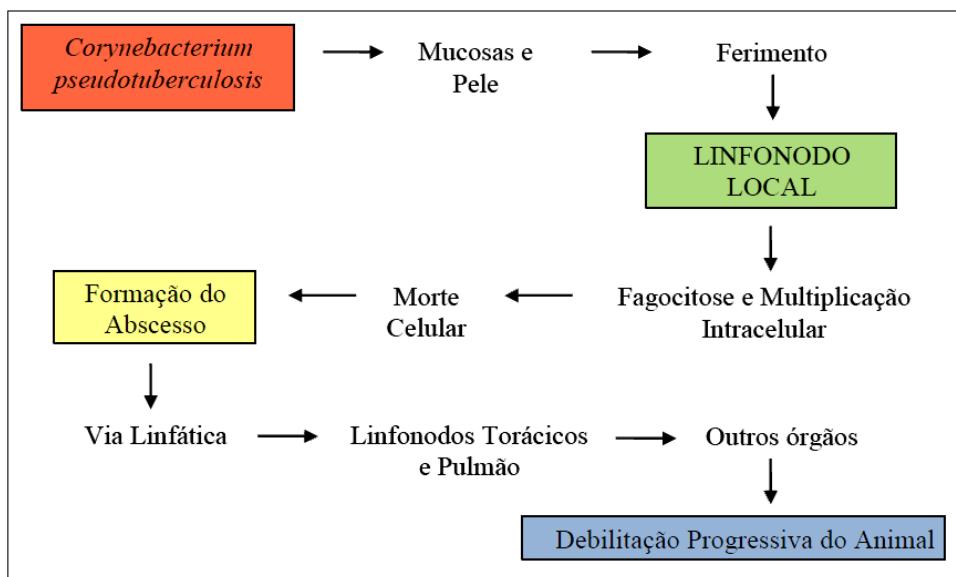
Como sinais clínicos observa-se linfonodos afetados com o volume aumentado, firmes e sensíveis à palpação (RASDOSTITIS *et al.*, 2002), sendo descritas duas formas clínicas: a forma superficial e a profunda, que podem estar associadas. A forma superficial acomete linfonodos mandibulares, pré-escapulares, pré-crurais parotídeos, cervical superficial, inguinal, retro-mamários, testiculares e sublácacos causando abscessos facilmente identificáveis ao exame físico (ALVES e OLANDER, 1999; RADOSTITIS *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2001; SMITH e SHERMAN, 1994; WILLIAMSOM, 2001).

Já a forma profunda acomete linfonodos internos, como mediastínicos, mesentéricos e viscerais, causando também abscessos, que muitas vezes resultam em problemas respiratórios, hepáticos ou esplênicos, neurológicos e reprodutivos (RADOSTITIS *et al.*, 2002; ROSA, 1996; SMITH e SHERMAN, 1994).

Clinicamente, a manifestação da doença ocorre pela presença de abscessos externos e desordens reprodutivas: abortos, mortalidade neonatal, diminuição de peso, atraso na maturidade sexual, redução na taxa de crescimento, diminuição na produção de lã e persistência da enfermidade no rebanho (ALONSO *et al.*, 1992).

Nos exames laboratoriais pode se observar anemia, leucocitose com neutrofilia e altos níveis de fibrinogênio, hipoproteinemia e hiperproteinemia por aumento de imunoglobulinas, principalmente IgG (PAULE *et al.*, 2003).

Após atingir os linfonodos locais, a infecção evolui para a fagocitose, multiplicação intracelular de *C. pseudotuberculosis*, seguidos da desintegração e morte celular. Esse processo é cíclico e recorrente, causando as lesões crônicas típicas da LC em ovinos (ALVES *et al.*, 1997). Através da via linfática, ocorre o acometimento de linfonodos torácicos e dos pulmões e, posteriormente, de outros órgãos causando debilitação progressiva do animal (ALVES *et al.*, 1997; BATEY, 1986c;) (Figura 4).



**Figura 4** - Esquema da evolução da patogenia da Linfadenite Caseosa.

Fonte: Alves *et al.* (1997), adaptado de Batey (1986).

## 2.7 IMUNOLOGIA

Ao contrário do que ocorre contra microrganismos extracelulares (e toxinas por eles secretadas) onde o principal mecanismo de defesa é a imunidade humoral, pois os anticorpos podem se ligar a esses elementos e auxiliar na sua eliminação, os microrganismos intracelulares sobrevivem a este mecanismo, proliferando dentro dos fagócitos e de outras células do hospedeiro, o que os tornam inacessíveis aos anticorpos circulantes. A defesa contra essas infecções está a cargo da imunidade celular, que funciona promovendo destruição dos microrganismos que residem nos fagócitos ou lisando as células infectadas (BURMESTER e PEZZUTO, 2003).

Os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas na resposta contra este microorganismo no estágio inicial pós-infecção (HARD, 1969; JOLLY, 1965a). Desta

forma, Lan *et al.* (1999), demonstraram que a presença destes tipos celulares pode ser crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e também secundária. Contudo, para o controle efetivo da infecção, além dessas células é necessária a presença de subpopulações de linfócitos, como CD4 e CD8, bem com de macrófagos ativados (JOLLY, 1965b; LAN *et al.*, 1998).

A fagocitose é o mecanismo de maior importância da imunidade natural contra microrganismos intracelulares (NORTH, 1978). Entretanto, bactérias intracelulares patogênicas sendo resistentes à degradação dentro dos fagócitos, tendem a causar infecções crônicas, difíceis de serem erradicadas. Segundo Tashjian e Campbell (1983), a resistência da *C. pseudotuberculosis* à morte e à digestão no interior dos fagócitos está relacionada aos lipídeos da parede celular bacteriana.

A formação de granulomas é um processo dependente da imunidade adaptativa que, nesse caso, é complexa e envolve tanto uma resposta imune humoral como mediada por linfócitos T (PAULE, 2003; El-Enbaawy *et al.*, 2005). Pépin *et al.*, (1994) observaram que há mais linfócitos T CD8 em granulomas no sítio de inoculação em comparação com aqueles presentes em linfonodos drenantes. Esta subpopulação de linfócitos está relacionada com a atividade efetora e citotóxica, podendo atuar como um mecanismo de proteção antibacteriana para conter a disseminação de macrófagos infectados.

A resposta imune humoral é uma resposta intensa e presente em animais imunizados e naturalmente infectados (VALE, 2003). Esta resposta por anticorpos é regulada por citocinas produzidas em decorrência da interação do antígeno com as células imunocompetentes (MCINTYRE *et al.*, 1993).

Cameron e Engelbrecht (1971) demonstraram a proteção desencadeada por anticorpos, através da imunização passiva de camundongos com soro de coelhos imunizados contra a *C. pseudotuberculosis*. Posteriormente, Yozwiak e Songer (1993) relataram o efeito protetor exercido por anticorpos anti-fosfolipase D, presentes antes da infecção, contra a disseminação da bactéria para os linfonodos. Entretanto, segundo Vale *et al.*, (2000, 2003) esta forte resposta humoral, por si só, não é capaz de eliminar a infecção sendo, contudo de extrema importância quando associada à resposta celular. Esses anticorpos não interferem com a multiplicação do microrganismo, mas são capazes de impedir a disseminação da infecção do local de inoculação para órgãos internos (MACHADO, 2004). A resistência às infecções causadas por bactérias intracelulares facultativas está relacionada às células T CD4+ e mais especificamente aos clones Th1, pelo aumento da atividade microbicida dos macrófagos, pela produção de IFN-gama e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-alfa).

O papel das células T CD8+ na resistência deste tipo de infecção está relacionado à capacidade de produzir IFN-gama e lisar as células infectadas (LAN *et al.*, 1998; CARMINATI, 2005). O papel do IFN-gama no controle da infecção pela *C. pseudotuberculosis* foi observado em ratos, nos quais foi detectado um aumento no crescimento bacteriano após a administração de anticorpos monoclonais anti-IFN-gama (LAN *et al.*, 1998). Além disso, estudos em animais que apresentam deleção do gene que codifica esta citocina também demonstraram fundamental importância do IFN-gama para a proteção imune do hospedeiro (PÉPIN *et al.*, 1997).

Hedden *et al.*, (1986), analisaram a quantidade de linfócitos T e B bem como as concentrações de IgG de cabras sadias e doentes e, observaram quantidades menores de linfócitos T em cabras doentes, enquanto as percentagens de células B apresentaram similaridade entre ambas as espécies. No que se refere às concentrações de IgG, observaram ainda resultados superiores nos doentes. Fato atribuível à característica do microrganismo atuar como parasito intracelular facultativo, comprometendo o sistema imunológico e consequentemente, reduzindo o número e a atividade das células T e aumento da síntese de imunoglobulinas. Isto poderia levar a pensar que a imunidade humoral teria um papel mais importante que a imunidade celular.

Além da resposta humoral mediada por anticorpos à infecção por *C. pseudotuberculosis* também induz a produção de várias citocinas formando um complexo de interação entre as citocinas do perfil inflamatório e pró-inflamatório, regulatório e anti-inflamatório.

TNF-alfa (Fator de Necrose Tumoral-alfa), uma citocina pró-inflamatória que atua aumentando a permeabilidade vascular recrutando neutrófilos e células mononucleares para o local da infecção, também estimula a atividade microbicida de neutrófilos e macrófagos. Sendo um agente indutor de coagulação é um importante agente na formação de granuloma (ROBBIS, 2005). O excesso dessa citocina pode causar além de febre algumas patologias, tais como hiperinflamação com necrose e caquexia além do choque séptico (JACOBS, 2007). Desta forma, esta citocina possui uma enorme importância na imunidade inicial contra *C. pseudotuberculosis*, sobretudo no local de início da infecção (ELLIS *et al.*, 1991; LAN *et al.*, 1998, 1999; PÉPIN *et al.*, 1997).

Já a interleucina-10 (IL-10) foi originalmente descrita como uma citocina produzida por células Th2 e mediadora de efeitos anti-inflamatórios, atuando primariamente em células fagocíticas e em células apresentadoras de抗ígenos, inibindo a transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF 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 e MOSMANN, 1989; OSWALD *et al.*, 1992; MOORE *et al.*, 2001). Além disso, esta citocina previne apoptose mediada pelo TNF-alfa sobre macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, possibilitando, a manutenção da infecção crônica (ROJAS *et al.*, 1999). No entanto, estudos em diversos modelos murinos demonstraram que a IL-10 além de regular a atividade das citocinas do perfil Th1 como IFN-gama, também regula a formação de fibrose (granuloma) mediada por citocinas do perfil Th2 como IL-4. Nessa regulação do granuloma a IL-10 interage com as citocinas do perfil Th1 como IFN-gama suprimindo a deposição de colágeno (WYNN, 2004).

As principais fontes de IL-10 podem ser as células T que produzem IFN-gama, células CD4+, CD25+ e foxp3, células Th2, macrófagos, principalmente, durante os estágios iniciais da fase aguda da infecção e/ou ainda por células infectadas ou expostas a componentes dos parasitas (POHL-KOPPE *et al.*, 1998; TRINCHIERI, 2001). Esta citocina para garantir a homeostase, regula a exacerbção tanto das citocinas Th1 quanto Th2, entretanto uma produção excessiva de IL-10 nos pulmões a torna pró-fibrótica (WINN, 2004).

Interferon-gama é considerada 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, 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, possuindo 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 (ABBAS, 2008; BOEHM *et al.*, 1997; MEYER *et al.*, 2005).

Desta forma, IFN-gama é o principal indutor da função efetora na infecção de macrófagos por micobactérias, desenvolvendo também um papel significativo na formação e organização de granulomas na resposta contra esse patógeno (EHLERS, 2001). Essa citocina induz macrófagos a produzirem óxido nítrico devido à ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS2), processo conhecido como via clássica ativação (HESS, 2001; WYNN, 2004).

A produção de IFN-gama 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. Além de IFN-gama, a IL-12 também é capaz de induzir a secreção de IL-10 pela mesma célula T (POHL-KOPPE *et al.*, 1998). Em caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis* mediante estímulo com antígeno somático com meio mínimo de cultura, houve baixa produção de IFN-gama, entretanto quando estimulados com antígeno secretado ocorreu alta produção dessa citocina (MEYER *et al.*, 2005; REGIS, 2001).

Pépin *et al.*(1991) sugeriram uma relação entre citocinas produzidas pelas células T CD4+ com o desenvolvimento do granuloma e a persistência da bactéria no hospedeiro quando observaram uma grande produção de IFN-gama e baixa produção de IL-4.

Lan *et al.*(1998) demonstraram que o uso de anticorpos anti-TNF-alfa e anti-IFNgama em camundongos, leva a disseminação deste microrganismo no hospedeiro, resultando na morte desses animais. Fortune *et al.*(2004) relatam à importância do IFN-gama, da IL-12 e TNF-alfa no controle da infecção micobacteriana em humanos e em camundongos.

Um desenvolvimento de uma resposta Th1 potente principalmente com a produção de IFN-gama diminui e/ou impede a formação do tecido fibroso (granuloma), mostrando que esta citocina possui uma forte atividade antifibrótica (WYNN, 2004). Sabe-se que IFN-gama estimula varias quimiocinas, sendo possível que essas reduzam a vascularização levando a hipoxia do granuloma gerando a necrose caseosa (EHLERS, 2001).

A interleucina-4 (IL-4) é uma citocina produzida primariamente por basófilos, eosinófilos, mastócitos e por subclasses de linfócitos T (as células Th2). Estudos vêm mostrando que as células T gama-delta também são produtoras dessa citocina (NELMS *et al.*, 1999). Esta citocina exerce um papel importante na regulação da diferenciação de células T virgens após estímulo antigênico. A IL-4 induz tais células a se desenvolverem em células capazes de produzir mais IL-4 e uma série de outras citocinas anti-inflamatórias e/ou regulatórias , incluindo IL-5, IL-10 e IL-13, bem como suprime o aparecimento de células T CD4 produtoras de IFN-gama, podendo promover em alguns casos a sobrevivência de patógenos por limitar a ativação de macrófagos (HESS, 2001; NELMS *et al.*, 1999). Além disto, a IL-4 induz a proliferação de células B ativadas, células T, timócitos e clones de células NK (PENE *et al.*, 1988).

Outra função de grande importância fisiológica é o controle exercido pela IL-4 na especificidade do “switch” da classe da imunoglobulina onde em humanos induz a produção de IgE e IgG4 e nos camundongos IgE e IgG1 (NELMS *et al.*, 1999). A IL-4 também é responsável pela ativação alternativa de macrófagos levando-os a uma maior expressão de receptores para manose, aumentando a fagocitose e produção de colágeno pela via da arginase-1, promovendo o remodelamento tecidual e formação de granulomas, mostrando com isso um potencial pró-fibrótico, assim como o TGF-beta e IL-13 (ABBAS, 2008; WYNN, 2004).

Estudos com camundongos deficientes para citocinas mostraram que a fibrose esta fortemente ligada ao desenvolvimento de uma resposta Th2 mediada principalmente por IL-4.

O desenvolvimento de uma forte resposta inflamatória Th1 mediada principalmente por IFN-gama promove uma redução no desenvolvimento de tecido fibrótico (WYNN, 2004).

Meyer *et al.* (2005), verificaram que os抗ígenos de *C. pseudotuberculosis* induziam resposta de imunidade celular, quantificada pela produção de IFN-gama, em cultivos de células sanguíneas *in vitro* e que a produção de IFN-gama era maior quando se utilizavam células de animais infectados, por outro lado quando se utilizavam células somáticas a produção de IFN-gama era menor, mostrando com isso a capacidade dos抗ígenos induzirem uma resposta celular, contribuindo para o diagnóstico da doença e adicionalmente para a produção de vacinas mais eficientes.

### 2.7.1 Imunidade contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A resposta imune promovida pelo hospedeiro contra a *C. pseudotuberculosis* é complexa e envolve tanto a resposta imune mediada por células quanto a resposta imune humoral (ELLIS *et al.*, 1991). No entanto, segundo relatos a principal resposta imune protetora contra a *C. pseudotuberculosis* é a imunidade mediada por células através de dois processos distintos e complementares: a morte dos microorganismos fagocitados, devido à ativação dos macrófagos pelas citocinas derivadas dos linfócitos, principalmente o IFN-gama, e a lise das células infectadas, efetuada pelas células T citolíticas (CD8+) (VALE, 2000).

Com a morte das células do sistema imunológico, ocorre a liberação do microrganismo no linfonodo drenante local, ocasionando a formação de lesões necróticas (JONES *et al.*, 2000). Então, as bactérias iniciam um novo ciclo de replicação, conseguindo colonizar os linfonodos regionais, e podendo atingir diversos órgãos e células (SONGER, 2005). Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo ocorre a formação de granulomas.

A lesão se inicia pelo aparecimento de células epitelioides que, posteriormente, são substituídas por necrose caseosa, sendo esta a característica predominante desta patologia. A massa caseosa vai sendo circundada por células epiteliais, linfócitos e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso; e à medida que a lesão progride, estas camadas celulares e fibróticas vão sofrendo necrose. (JONES *et al.*, 2000).

A organização e composição celular dos granulomas gerados pela infecção por *C. pseudotuberculosis* são similares àquelas observados nas infecções por outras bactérias intracelulares, particularmente com os granulomas induzidos por *Mycobacterium tuberculosis* (FLYNN *et. al.*, 1993) ou *Listeria monocytogenes* (NAKANE *et. al.*, 1989). Entre as similaridades, pode ser lembrada a predominância dos linfócitos T CD8 (MODLIN *et. al.*,

1983), importantes pelas suas atividades citotóxicas e de produção de IFN-gama, responsável neste caso pela ativação de macrófagos pela via clássica (KAUFMANN, 1988).

Diversas citocinas são expressas durante a infecção experimental com *C. pseudotuberculosis*, entre as quais se destacam a produção de IL-2 e IL-4 em linfonodos drenantes e de TNF-alfa e IFN-gama no sítio de inoculação. Estas citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento da resposta imune celular, sendo que o IFN-gama possui grande importância na ativação de macrófagos, os quais são os responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares (Pépin *et al.*, 1997). De acordo com Jolly (1965a), a resolução da infecção por *C. pseudotuberculosis* está relacionada com a presença de macrófagos ativados dentro da lesão.

Estudos veem mostrando que o envolvimento da resposta celular, mais especificamente, da indução de uma resposta Th1, é a mais satisfatória na resistência contra bactérias intracelulares facultativas (KAUFMANN, 1993), entretanto, o desenvolvimento de um perfil Th2 também é necessário.

O papel da resposta imune humoral na proteção contra *C. pseudotuberculosis* foi demonstrado em ensaios de imunização passiva, nos quais a administração de soros antitoxina e antibactéria protegeram camundongos desafiados com a bactéria (Paule, 2003). Contudo, Irwin e Knight (1975) relataram que a proteção contra *C. pseudotuberculosis* é dependente de linfócitos T e está associada com a diminuição da resposta humoral, ressaltando-se a importância da imunidade mediada por células.

### 2.7.2 O papel do Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )

Identificados pela primeira vez por Isaacs e Lindenmann (1957) como uma substância capaz de proteger as células de infecções virais, os interferons de uma forma geral são proteínas com atividades antiviral, antitumoral e imunorreguladora, produzidas pelas células frente a uma variedade de estímulos. (GALVANI, *et al.*, 1999; KADOWAKI, 2000)

Particularmente, o IFN- $\gamma$  ou fator de ativação de macrófagos é uma citocina pró-inflamatória crucial na resistência infecções, que está envolvida com: mecanismos de defesa, estabelecimento de processos inflamatórios e auto-imunidade, controle de programas fagocitários, bactericidas e tumoricidas em monócitos/macrófagos, expressão de抗ígenos de histocompatibilidade (MHC) classe II, produção de mediadores derivados de macrófagos tais como o TNF-alfa, IL-1, IL-12 e óxido nítrico, e regulação negativa da síntese de mediadores

antiinflamatórios tais como a IL-10 (EL-HASHEMITE *et al.*, 2004; FARRAR e SCHREIBER, 1993) Indivíduos que possuem mutações nos receptores dos genes desta citocina são potencialmente mais susceptíveis a agentes infecciosos, incluindo cepas de Micobactérias e Corynebactérias (KADOWAKI, 2000).

Secretado por células NK, macrófagos e células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, o IFN- $\gamma$  possui receptores em quase todas as células onde é capaz de ativar diversas respostas antimicrobianas. Nos tecidos, seus alvos são as células não infectadas, macrófagos, células B em proliferação e células T CD4<sup>+</sup>. Estima-se que esta citocina regule a expressão de diversos genes relacionados com a produção de proteínas envolvidas na criação de barreiras efetivas contra os patógenos (PESTKA, 2004).

Esta citocina pleiotrópica apresenta uma função específica para cada célula alvo incluindo aumento da expressão de MHC e coestimuladores em APCs amplificando a apresentação antigênica e a fase de reconhecimento da resposta imune, diferenciação de monócitos, ativação do metabolismo oxidativo de macrófagos e neutrófilos - importantes para a fagocitose, potencialização da ação do TNF e da atividade citolítica de NK, além de atuar na conversão de linfócito Th0 em linfócito Th1, e de induzir nas células B a mudança para a produção de anticorpos tipo IgG2a e bloquear a mudança de classe para IgE (induzida pela IL-4), inibindo a proliferação das células Th2 (GALVANI, *et al.*, 1999; JANEWAY, 2002; TAYLOR, 2004).

Assim, o IFN- $\gamma$  exerce um papel crítico nas imunidades inata e adaptativa, participando na resposta do hospedeiro nas infecções bacterianas, principalmente por patógenos intracelulares promovendo um acúmulo de polimorfonucleares no local da inflamação (GALVANI, *et al.*, 1999). Quando secretado por NK em resposta ao reconhecimento de componentes desconhecidos de microorganismos ou em resposta à IL-12, age como um mediador da resposta imune inata. Quando é produzido por células T em resposta ao reconhecimento antigênico atua na resposta imune adaptativa e sua resposta é acentuada por IL-10 e IL-18 (JANEWAY, 2002).

Consequentemente o IFN- $\gamma$  é o principal ativador de macrófagos acentuando sua ação microbicida mediante a estimulação da síntese de intermediários reativos de oxigênio e do óxido nítrico, sendo que media estes efeitos, principalmente ativando a transcrição de genes que codificam as enzimas fagócito-oxidase e sintase indutora de óxido nítrico necessárias para a geração de intermediários reativos de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio, respectivamente. Estas moléculas reativas são produzidas no interior dos lisossomos e a fusão destes ao fagossoma resulta na destruição dos microorganismos (JANEWAY, 2002).

### 3     OBJETIVOS

#### 3.1    OBJETIVO GERAL:

Avaliar e comparar aspectos da resposta imunológica de camundongos da linhagem C57Black/6 selvagem e *knockout* para IFN-gama, durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

#### 3.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a **cinética da infecção e disseminação bacteriana** através da contagem de unidades formadoras de colônias, em cultura de células dos linfonodos de camundongos C57Black/6 selvagem e *Knockout* IFN-gama, infectados por *C. pseudotuberculosis*;
- Determinar o **padrão de migração celular** para a cavidade peritoneal em camundongos C57Black/6 selvagem e *Knockout* IFN-gama infectados por *C. pseudotuberculosis*;
- Analisar e comparar o **peso do baço** dos camundongos C57Black/6 selvagem e *Knockout* IFN-gama infectados por *C. pseudotuberculosis*;
- Avaliar a **cinética da resposta imune humoral** através da produção de subclasses de IgG específicas, em camundongos C57Black/6 selvagem e *Knockout* IFN-gama infectados por *C. pseudotuberculosis*;
- Avaliar a **cinética da resposta imune celular** através da imunofenotipagem e produção de citocinas em células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem e *Knockout* IFN-gama infectados por *C. pseudotuberculosis*.

#### **4.0 RESULTADOS**

4.1 MANUSCRITO: Avaliação da Influência do Interferon-Gama durante a Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em Modelo Murino.

O presente estudo objetivou avaliar a influência do interferon-gama durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino, originando assim o manuscrito a ser submetido à Veterinary Immunology and Immunopathology.

**Avaliação da Influência do Interferon-Gama durante a Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em Modelo Murino.**

Heidiane Alves dos Santos<sup>a</sup>, Ricardo Evangelista Fraga<sup>a,b</sup>, Milton Galdino Oliveira Neto<sup>a</sup>, Marcos da Costa Silva<sup>a,c</sup>, Andréia Pacheco<sup>a</sup>, Geraldo Pedral Sampaio<sup>a</sup>, Vera Lúcia Costa Vale<sup>a,c</sup>, Soraia Castro Trindade<sup>a,d</sup>, Lilia Moura Costa<sup>a</sup>, Roberto Meyer<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Universidade Federal da Bahia: Departamento de Biointeração - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Salvador-BA, Brasil; <sup>b</sup>Universidade Federal da Bahia: Núcleo de Tecnologia em Saúde, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Vitória da Conquista-BA, Brasil.

<sup>c</sup>Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e da Terra-DCET - Campus II, Alagoinhas – BA, Brasil; <sup>d</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil.

**\*Autor correspondente:**

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

Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil

CEP: 40.110-100

Tel.: 55-71- 8757-6364

Fax: 55-71-3235-9682

Endereços de e-mail: [heidiane.alves@gmail.com](mailto:heidiane.alves@gmail.com) (H. Santos)  
[rmeyer@ufba.br](mailto:rmeyer@ufba.br) (R. Meyer)

## RESUMO

A linfadenite caseosa é uma doença infecto-contagiosa crônica, de ocorrência mundial que acomete pequenos ruminantes, causando grandes perdas econômicas. Esta doença tem como agente etiológico a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e caracteriza-se pela formação de granulomas em gânglios linfáticos superficiais, podendo também acometer órgãos e linfonodos internos, como forma de resposta do sistema imune do hospedeiro à penetração deste agente que resiste a ação bactericida das células fagocíticas. Estudos têm demonstrado a importância de citocinas na defesa de patógenos intracelulares facultativos, inclusive para *C. pseudotuberculosis*, destacando-se o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) citocinas característica de células Th1, que pode estar envolvida na proteção à patógenos intracelulares. O presente estudo avaliou aspectos da resposta imunológica de camundongos da linhagem C57Black/6 selvagem e *knockout* para IFN- $\gamma$ , durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Os grupos foram acompanhados ao longo de 7 e 14 dias após infecção intraperitoneal com  $10^7$  UFC, durante os quais foram avaliados a disseminação bacteriana, a frequência de granulomas, a variação de peso do baço, o padrão de migração celular para a cavidade peritoneal, além da resposta imune humoral através da dosagem de IgG e subclasses e resposta imune celular através da dosagem de citocinas e imunofenotipagem. Os camundongos *knockout* para IFN- $\gamma$  se mostraram mais suscetíveis à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* apresentando maior disseminação bacteriana nos linfonodos mesentéricos, maior frequência de granulomas, aumento considerável no peso do baço, intensa migração celular para a cavidade peritoneal, principalmente neutrófilos e macrófagos e expressão de linfócitos T CD8+ nas células esplênicas, e consequentemente menor expressão de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias. Estes achados apontam para a importância do IFN- $\gamma$  na resposta imune a patógenos intracelulares a exemplo de *C. pseudotuberculosis*, ao tempo em que demonstra a resposta deficiente do sistema imune dos animais no cauteleado à infecção.

**Palavras chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Linfadenite caseosa, Interferon gama, C57Black/6, Knockout.

## 1. INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura é uma atividade rural de grande importância para o Brasil, principalmente para os pequenos e médios produtores da região Nordeste, particularmente da zona semi-árida, pois os rebanhos de pequenos ruminantes constituem as principais fontes econômicas e nutricionais dessa população (DORELLA *et al.*, 2006a; MEYER, 2004). Também exercem uma função social de elevada importância, devido à fixação do homem no campo, contribuindo, assim, para a diminuição do êxodo rural. Entre as doenças que acometem os rebanhos caprinos e ovinos nesta e em outras regiões brasileiras com alta prevalência (MEYER, 2004; SEYFFERT *et al.*, 2009), está a linfadenite caseosa, doença crônica infecciosa cujo agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, bacilo gram positivo, pleiomórfico, patógeno intracelular facultativo de fagócitos, relacionado filogeneticamente com *Mycobacterium tuberculosis* (DORELLA, 2006a; PASCUAL *et al.*, 1995).

A transmissão da doença acontece principalmente através da pele não íntegra, porém pode acontecer através do aleitamento por fêmeas doentes e pela eliminação de aerossóis contaminados. As manifestações desta doença, nos pequenos ruminantes, são caracterizadas principalmente por caseação necrótica dos linfonodos (MEYER *et al.*, 2005). Desta forma, a bactéria, ao adentrar no organismo é carreada para os linfonodos superficiais e drenantes, onde granulomas característicos são produzidos (BATEY, 1986b).

Estudos têm demonstrado a importância de citocinas na defesa de patógenos intracelulares facultativos, inclusive para *C. pseudotuberculosis* (LAN *et al.*, 1998, 1999; ELLIS *et al.*, 1991). Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina que assume grande importância por promover a modulação da resposta imune pelo controle da expressão das moléculas de MHC classes I e II por diversos tipos de células, 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, além de também ter a capacidade de regular a ativação e a diferenciação das células T CD4+, o que torna esta citocina um componente chave no curso da resposta imune (BOEHM *et. al.* 1997; MEYER *et al.*, 2005; ABBAS, 2008). Adicionalmente, IFN- $\gamma$  é o principal indutor da função efetora na infecção de macrófagos por micobactérias, desenvolvendo também um papel significativo na formação e organização de granulomas na resposta contra esse patógeno (EHLERS, 2001). Com isso, o uso de camundongos *Knockout* para interferon-gama nos possibilita uma análise comparativa

da resposta imunológica diretamente relacionada às funções exercidas por esta citocina na infecção experimental destes animais por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Neste trabalho buscou-se avaliar e comparar aspectos da resposta imunológica de camundongos da linhagem C57Black/6 selvagem e *knockout* para IFN-gama, durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 CULTIVO BACTERIANO

Foi utilizada a linhagem T1 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, proveniente da coleção do laboratório de Microbiologia do ICS – UFBA. A linhagem foi isolada, a partir de granuloma em linfonodo caprino, na região de Santa Luz no estado da Bahia, e identificada pelo teste “API coryne” (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França). Em seguida, a linhagem foi semeada em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e cultivada a 37°C, por 48 horas.

#### 2.2.1 Preparo do inóculo

Para a infecção, a massa bacteriana foi lavada, centrifugada a 3.000 g a 4°C durante 30 minutos, ressuspensa em solução fisiológica, e diluída para a concentração de  $10^7$  UFC/mL, para a inoculação. Para obtenção do antígeno secretado foi realizado o fracionamento em três etapas, o sobrenadante da cultura foi saturado com 30% de sulfato de amônia à temperatura ambiente, sob leve agitação. Depois que o pH 4.0 foi ajustado para o nível adequado pela adição de HCl concentrado, n-butanol na mesma proporção de volume de meio de cultura foi adicionado. Após agitação em vortex por 1min e repouso por 1h, o anel protéico foi coletado e centrifugado a 1350 g durante 10min e a interface precipitada foi coletada e dissolvida em volumes pequenos de tampão tris 20 mM, pH 7,4 (500µl de extrato para 5 mL de tampão). Este extrato foi concentrado por ultrafiltração com membrana de ponto de corte de 10 kDa.

## 2.3 ANIMAIS / INFECÇÃO

Foram utilizados, no experimento, 28 camundongos, sendo 14 da linhagem C57Black/6 selvagem (WT) e 14 C57Black/6 *knockout* (KO) para IFN-gama, com idade entre 6 - 8 semanas, de ambos os sexos, adquiridos no Biotério da Fundação Oswaldo Cruz – RJ (figura 5). Estes animais foram subdivididos em 04 grupos organizados da seguinte forma:

- ❖ Grupo C57Black/6 WT:
  - Subgrupo 1 - 04 animais controle negativo
  - Subgrupo 2 - 10 animais infectados com a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*
- ❖ Grupo C57BL6 KO:
  - Subgrupo 1 - 04 animais controle negativo
  - Subgrupo 2 - 10 animais infectados com a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*

O protocolo experimental foi delineado de forma que 20 animais foram experimentalmente infectados com a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*, nos quais foi inoculado 1 mL de solução salina contendo  $10^7$  unidades formadoras de colônia (CFU) da bactéria, injetados por via intraperitoneal, enquanto que os 08 camundongos controles foram inoculados com 1 mL de solução fisiológica pH 7,4, pela mesma via. Em cada tempo (07 e 14 dias) pós inoculação, foram sacrificados 05 animais infectados e dois animais controles, de cada um dos grupos experimentais (C57Black/6 WT e C57Black/6 KO). Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical.

Após o sacrifício, foi coletado sangue destes animais por punção cardíaca para retirada do soro e posterior dosagem de imunoglobulinas. Em seguida os animais foram pesados e, sempre em condições estéreis, foi realizada uma incisão na região abdominal (na altura da linha alba) para remoção dos órgãos. Posteriormente o baço foi pesado e procedeu-se a obtenção das células esplênicas para a quantificação de citocinas e para a separação das subpopulações de linfócitos.

## 2.4 DISSEMINAÇÃO BACTERIANA

Para avaliar a disseminação bacteriana, após o sacrifício dos animais foi removido um linfonodo mesentérico (LNM). Com rigor asséptico, a peça foi transferida para recipiente estéril, no qual foi divulsionado com o auxílio de agulhas e homogeneizado em 500 $\mu$ L de

solução fisiológica estéril, gerando uma suspensão celular, da qual uma porção de 100 $\mu$ L foi semeada em placas contendo agar BHI, incubadas por 48 horas a 37 °C, em estufa. A cultura do LNM foi realizada nos tempos 07 e 14 dias. A contagem das bactérias foi realizada após 48 horas de incubação e foi expressa em Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

## 2.5 PADRÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para determinar o padrão da migração celular para a cavidade peritoneal após infecção com *C. pseudotuberculosis*, foi introduzida 1,5mL de solução fisiológica estéril na cavidade abdominal dos animais. Desta forma, massageando o abdômen do animal por em média 30 segundos, recuperou-se o máximo do líquido introduzido utilizando para isto uma seringa milimetrada. Após definição do volume recuperado, este foi acondicionado em microtubos eppendorf, dos quais 40  $\mu$ l foram utilizados para posterior contagem de células totais através de um contador automático de células (Hemocytometer).

Em seguida, foi realizado o citoesfregaço (Cytospin) em duplicata, acrescentando 60 $\mu$ L do lavado em cada caçapa do aparelho para centrifugação por 16 minutos a 500rpm em temperatura ambiente. Em seguida, após a retirada das lâminas do aparelho e secagem das mesmas, estas foram submetidas a uma coloração de Wright. Finalmente, foi feita a contagem diferencial de leucócitos, utilizando um microscópio óptico em objetiva de imersão (aumento de 1000X).

## 2.6 RESPOSTA IMUNE

A avaliação da resposta imune, dos camundongos infectados com *C. pseudotuberculosis*, foi realizada para as duas vertentes, a humoral e a celular. A resposta imune humoral foi avaliada pela mensuração da produção de anticorpos específicos no soro, enquanto que a resposta imune celular foi avaliada pela imunofenotipagem e da produção de citocinas em esplenócitos, por citometria de fluxo.

#### 4.6.1 Resposta Imune Humoral

A avaliação da produção de anticorpos (IgG total e subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) anti- *C. pseudotuberculosis* (antígeno somático) foi realizada em amostras de soro obtidas com quatorze dias após infecção. Uma vez coletado o sangue por punção cardíaca, as amostras de cada animal foram acondicionadas em microtubos eppendorf, e incubadas a temperatura ambiente por um período de uma a duas horas para permitir a coagulação. Em seguida, estes tubos foram centrifugados a 1500 g e a temperatura ambiente, por 10 minutos. Por fim as amostras de soro coletadas foram armazenadas a -20 °C até o momento de uso.

##### A) ELISA Indireto para detecção de IgG e subclasses

A produção de anticorpos específicos IgG e subclasses (IgG 1, IgG 2a, IgG 2b e IgG3) foi avaliada através de ensaio imunoenzimático ELISA. Resumidamente, placas de microtitulação foram sensibilizadas com 1 $\mu$ g/100 $\mu$ l por poço de antígeno somático, em tampão carbonato-bicarbonato e a seguir incubadas *overnight* a 4°C, lavadas duas vezes em PBS-Twenn 20, bloqueadas com 200  $\mu$ l de leite desnatado (5%) em PBS-Twenn (por 2 horas a 37°C). Após uma lavagem, adicionou-se 50  $\mu$ l de soro diluído 1:100 em PBS-T contendo leite desnatado 1%, incubou-se por 1 hora a 37°C e em seguida, estas foram lavadas sete vezes com PBS-Twenn 20. Acrescentou-se 50  $\mu$ l de conjugado, que consistiu em IgG de coelho conjugada com peroxidase, contra IgG total ou contra cada subclasse (anti-IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) diluído 1: 5.000 em PBS-Twenn 20, leite desnatado 1%, incubou-se por 45 minutos a 37°C. Após sete novas lavagens, adicionou-se 50 $\mu$ l de solução reveladora TMB (tetrametilbenzidina), deixando por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. A reação foi interrompida com 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N e a leitura foi feita em leitor automático de ELISA, com duplo filtro de 450 nm e 655 nm. As detecções dos anticorpos específicos foram quantificadas como densidade óptica (DO).

#### 2.6.2 Resposta Imune Celular

Para a avaliação da resposta imune celular o baço de cada animal foi removido em condições assépticas, e transferido para uma placa de petri de poliestireno. Em seguida, cada

órgão foi pesado e retirado 30mg deste para maceração em 500 µL de solução inibidora de proteases gerando uma suspensão celular.

Esta suspensão foi submetida à centrifugação a 450 xg por 10 minutos à temperatura de 4°C. A partir de então o sobrenadante das amostras foi devidamente acondicionado à temperatura de -20°C até o momento de uso para a quantificação de citocinas e sedimento celular de cada amostra foi ressuspenso em 3,0 mL de solução fisiológica, a qual foi submetida à contagem total de células num contador automático de células (Hemocytometer CELM cc-530), a fim de ajustar a concentração celular necessária para a imunofenotipagem no citômetro de fluxo de 500 000 células para 500 µL de suspensão.

#### **A) Imunofenotipagem (Citometria de Fluxo)**

Para a fenotipagem das células esplênicas, dos animais sob experimentação, foram utilizados anticorpos ligados a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC): anti-CD4 para detecção de linfócitos T auxiliares e anti-CD8 para detecção de linfócitos T citotóxicos (Invitrogen). Todos os anticorpos monoclonais (AcMO) foram previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso, fixada em 2µL diluídos 1:10 em solução fisiológica. As células esplênicas foram ressuspensas em solução fisiológica, ajustadas em 500.000 células diluídas em 500 µL de solução. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA) usando o programa CellQuest (Becton–Dickinson, Canadá). Para análise dos dados utilizou-se o Flowjo (Tree Star Inc, Califórnia, EUA).

#### **B) Produção de citocinas (Citometria de Fluxo)**

Para a mensuração da produção das citocinas, foi utilizado um homogenato do baço obtido conforme descrição anterior em 4.6.2. Para isso, um volume de aproximadamente 300 µL da suspensão de esplenócitos de cada animal foi acondicionado a -20 °C até o momento da dosagem.

As dosagens de citocinas nestes sobrenadantes de esplenócitos resultantes da maceração do órgão foram realizadas através de um ensaio para detecção de citocinas por Citometria de Fluxo utilizando “Kits” comerciais Mouse Th1/Th2/Th17/Th22 13plex – Flow Cytomix (eBioscience: Bender MedSystems GmbH), para quantificar IL-1 $\alpha$  , IL-2, IL-4, IL-5,

IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27 e TNF- $\alpha$ , de acordo com as instruções do fabricante, resumidas a seguir:

Inicialmente os padrões de citocinas foram reconstituídos em água destilada estéril de acordo com a concentração previamente recomendada na etiqueta de cada tubo. Logo após estes tubos foram levados ao vórtex para homogeneização por aproximadamente 15 segundos, e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o primeiro passo foi preparar o mix de padrões, em um tubo denominado S1, com o acréscimo de 5 $\mu$ L de cada padrão de citocina e 35 $\mu$ L de tampão de ensaio (kit) diluído em água destilada estéril 1:10 para obter um volume final de 100 $\mu$ L. Após o mix padrão ser levado ao vórtex para homogeneização por aproximadamente 15 segundos, e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, este foi submetido à diluições seriadas em 07 tubos contendo 50 $\mu$ L de tampão de ensaio em cada um, sendo sempre transferido 25 $\mu$ L de S1 a S7, com S8 contendo apenas tampão de ensaio (branco). O segundo passo foi preparar o mix de beads de captura (kit), diluído em tampão de ensaio, que foi centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente desprezado e o “*pellet*” resuspensos com o mesmo volume de tampão de ensaio. O terceiro passo consistiu no preparo do mix de conjugado biotinilado (kit) também diluído em tampão de ensaio. Desta forma o ensaio foi realizado, adicionando em tubos devidamente identificados os volumes descritos na sequência: padrões e amostras, em seguida o mix de beads e por último o mix de conjugados biotinilados; Estes foram incubados ao abrigo de luz e a temperatura ambiente por 2 horas; adicionado 1ml de tampão de ensaio em cada tubo; centrifugados a 7500 rpm durante 5 minutos; removido 700  $\mu$ L o sobrenadante e novamente lavado com o mesmo volume de tampão; removido o sobrenadante e adicionado 20  $\mu$ L de streptoavidina-PE; homogeneizados e incubados no escuro por 1 hora; as amostras foram novamente lavadas duas vezes e por fim resuspensas em 500 $\mu$ L de tampão de ensaio e acondicionadas isentas de iluminação a 4°C para leitura overnight no citômetro de fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o FlowCytomix Pro Software, conforme orientações do fabricante.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o objetivo de avaliar e comparar as respostas humorais, produção de anticorpos, e as respostas celulares, proliferação e produção de citocinas, bem como o padrão de migração celular obtidos com infecção de camundongos selvagens e *Knockout* por *C.*

*pseudotuberculosis* foram empregados testes estatísticos não paramétricos em função da distribuição anormal dos dados. Para comparar a magnitude das variações das amostras, foi realizada a análise de variância através do teste de Kruskal-Wallis (FISHER, 1993; BIOSTAT, 2007).

As tendências centrais dos grupos independentes, dois a dois, foram comparadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Todas as análises dos dados obtidos foram feitas com o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 14.0 para Windows. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valores de  $p < 0,05$ .

### **3.0 RESULTADOS**

Nos tópicos que a seguir serão descritos os resultados obtidos nos experimentos realizados para avaliar a participação de segmentos efetores da defesa murina na resposta imune gerada contra uma linhagem de *C. pseudotuberculosis*. Para tal foram utilizados dois grupos experimentais sendo um grupo composto por animais C57Bl/6 WT e outro grupo de camundongos C57Bl/6 *KO-IFN*.

#### **3.1 AVALIAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO BACTERIANA**

Os resultados do crescimento microbiológico de *C. pseudotuberculosis* estão relacionados na tabela 2. Entretanto, podemos ainda observar de forma individualizada os resultados do crescimento microbiológico nas culturas da suspensão do linfonodo mesentérico de cada animal na tabela 1.

#### **3.2 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE GRANULOMAS**

Após incisão na região abdominal dos animais e a partir da remoção de seus órgãos, procedeu-se a inspeção apurada em toda a carcaça, com o propósito de verificar a presença de alterações granulomatosas. Assim, tabela 3 mostra o número total de animais que apresentaram granulomas nos diferentes grupos ao longo do tempo de infecção experimental.

Nesta percebe-se que o grupo de camundongos C57Black/6 *KO IFN*, foi o único que apresentou granulomas no 14º dia de infecção com a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*. Deve-se salientar, entretanto, que neste grupo todos os animais desenvolveram granulomas em alguma região anatômica.

Na tabela 4 tem-se uma descrição das diferentes regiões anatômicas onde os granulomas foram encontrados no grupo de camundongos *KO-IFN*. No entanto, apesar de apenas cinco animais observados apresentarem granulomas, estes abcessos se desenvolveram em diferentes regiões anatômicas no mesmo animal, justificando assim elevado número apresentado.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO PESO DO BAÇO

A figura 1 mostra os resultados obtidos na determinação da relação peso total do baço/carcaça de camundongos C57Black/6 WT e C57Black/6 *KO-IFN $\gamma$* , 07 e 14 dias após infecção por  $10^7$  UFC de *C. pseudotuberculosis*. Comparando-se os tempos de infecção (7 e 14 dias), constata-se que houve diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ) no peso do baço dos animais KO infectados demonstrando um aumento nestes valores. Na comparação entre os grupos WT e KO, verificou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no peso do baço dos animais, 7 e 14 dias após infecção, sendo que os camundongos KO apresentaram os maiores valores. No entanto, a comparação entre animais KO (infectados x controles) mostrou uma tendência a aumento no peso do baço dos animais infectados no 14º dia após infecção, porém este valor ( $p=0,053$ ) não foi estatisticamente significativo.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR

#### 3.4.1 Análise da contagem total de células

Para contagem total de células, foram utilizados 40 $\mu$ L do lavado recuperadas da cavidade peritoneal 07 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*. Na figura 2 está graficamente representada a avaliação do número total de células do lavado peritoneal dos camundongos C57Black/6 WT e C57Black/6 *KO-IFN $\gamma$* , 07 e 14 dias após infecção por  $10^7$  UFC de *C. pseudotuberculosis*. Nesta, uma comparação do teor de células nos diferentes

tempos mostrou que o grupo de animais C57Black/6 *KO-IFN $\gamma$*  teve uma significativa variação ( $p < 0,05$ ) na contagem total de células durante os tempos experimentais, com uma redução desta quantidade no 14º dia pós infecção. Ao contrário nos camundongos C57Black/6 WT não houve diferença significativa nos tempos analisados. Por conseguinte, a comparação do perfil celular entre os grupos de camundongos WT e KO apresentou diferença estatística no 7º dia pós infecção. A análise comparativa da quantidade de células presente no lavado dos animais KO infectados e no grupo controle percebe-se que houve uma tendência a aumento do número de células no grupo infectado com relação ao grupo controle aos 7 dias pós infecção, não configurando entretanto valores estatisticamente significativos ( $p=0,053$ ).

### 3.4.2 Análise da contagem diferencial de células (Leucograma)

Na determinação do diferencial de células também foi utilizado o lavado peritoneal dos camundongos 07 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.

Os resultados obtidos a partir das lâminas do citoesfregaço (Cytospin), e coloração de Wright e observadas ao microscópio óptico para a contagem diferencial de células estão dispostos na figura 3, onde avaliou-se a frequência de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos nos diferentes grupos experimentais. Desta forma, observou-se que no grupo de animais WT quando comparados camundongos controle e infectados houve um variação no teor de neutrófilos em ambos os tempos de infecção e no teor de macrófagos aos 14 dias de infecção, sendo que os animais infectados apresentam as maiores concentrações, configurando diferença estatisticamente significante ( $p<0,05$ ). Resultados similares foram observados no grupo de camundongos *KO-IFN*, sendo que nestes os animais infectados tiveram maiores valores de neutrófilos e macrófagos tanto com 7 quanto com 14 dias de infecção, com diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ). Por sua vez, no grupo controle, comparando os animais WT com os animais *KO-IFN* percebe-se que houve diferença ( $p<0,05$ ) apenas no número de linfócitos, onde os maiores valores foram dos controles *KO-IFN*, em ambos os tempos experimentais. Já fazendo esta mesma comparação (WT x *KO-IFN*) no grupo de animais infectados obteve-se diferença estatística ( $p<0,05$ ) não só para linfócitos, mas também para macrófagos e neutrófilos aos 7 dias de infecção, e aos 14 dias apenas de macrófagos, porém sempre o camundongo *KO-IFN* com os maiores números de células.

### 3.5 CINÉTICA DE ANTICORPOS PRODUZIDOS AO LONGO DA INFECÇÃO POR *C. pseudotuberculosis*.

Na avaliação da resposta imune humoral, a produção de anticorpos específicos IgG e subclasses foi realizada através do ensaio imunoenzimático ELISA utilizando o soro, aos 14 dias após infecção experimental dos camundongos por *C. pseudotuberculosis*.

Os resultados obtidos expressos nas figuras 4 e 5 demonstraram que os grupos de camundongos WT e KO não apresentaram diferença estatisticamente significante nos níveis de resposta anticórica, não havendo assim variação detectável expressiva na DO, comparando os grupos testados. Entretanto, o controle positivo, que refere-se a um camundongo da linhagem Swiss infectado no mesmo tempo de avaliação, sob as mesmas condições com *C. pseudotuberculosis* que apresentou o valor de 1.980 de DO.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem da suspensão de células esplênicas para a detecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> mostrado na figura 6, traz que no grupo de animais WT, comparando controles e infectados, aos 7 dias de infecção houve diferença estatística ( $p<0,05$ ) na expressão de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, enquanto que no 14º dia a diferença estatística ( $p<0,05$ ) foi na expressão de T CD8<sup>+</sup>. Entretanto, o grupo de animais *KO-IFN* não apresentou diferença estatisticamente significante na expressão destes linfócitos, entre controles e infectados, em nenhum dos tempos experimentais. Sobretudo, quando comparados os grupos de camundongos WT e *KO-IFN* entre si, percebe-se que entre os controles há uma diferença estatística na expressão de células T CD8<sup>+</sup> sendo que os animais KO apresentaram os maiores valores em todos os tempos. Já entre animais infectados, a comparação dos grupos WT e *KO-IFN* mostrou diferença estatística ( $p<0,05$ ) apenas no 14º dia de infecção para as células T CD4<sup>+</sup>, sendo que a maior expressão foi no grupo dos camundongos WT.

### 3.7 PRODUÇÃO CITOQUINAS POR CÉLULAS ESPLÊNICAS DURANTE A EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO POR *C. pseudotuberculosis*.

As figuras de 7 a 18 apresentam a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-27 pelas células esplênicas aos 7 e 14 dias

após infecção por *C. pseudotuberculosis*. Os valores apresentados nos gráficos a seguir, representam a média de intensidade de fluorescência (MIF), da detecção de citocinas no sobrenadante da suspensão de esplenócitos submetido à leitura no citômetro de fluxo.

A figura 7 mostra os resultados obtidos na dosagem do TNF  $\alpha$ , onde níveis da produção pelas células esplênicas dos camundongos C57Bl/6 apresentaram diferença estatisticamente significante ( $p<0,05$ ) entre os grupos WT e *KO-IFN* aos 14 de infecção experimental.

A figura 8 refere-se aos resultados da dosagem de interleucina 2 (IL-2), e neste pode-se observar diferença estatística ( $p<0,05$ ) no grupo de animais WT comparando os tempos de infecção, o mesmo não ocorre no grupo *KO-IFN* onde percebe-se uma variação ( $p=0,076$ ), mas não o suficiente para configurar valores estatisticamente significantes. No grupo de camundongos KO constatou-se diferença nos níveis de IL-2 do grupo controle quanto comparado com o grupo infectado no segundo tempo após infecção.

Já nos resultados apresentados na figura 9 para a dosagem de interleucina-1alfa (IL-1 $\alpha$ ), observa-se diferença estatisticamente significante ( $p<0,05$ ) apenas quando comparados os tempos de infecção dos camundongos *KO-IFN*, com o aumento nos níveis desta citocina no 14º dia após infecção.

Na dosagem de interleucina 6 (IL-6) representada na figura 10, obtivemos diferença estatisticamente significante ( $p<0,05$ ) na comparação entre os grupos WT e *KO-IFN* aos 14 dias após infecção.

A dosagem da interleucina 4 (IL-4) representada na figura 11 revelou níveis diferenciados entre os grupos WT e *KO-IFN* aos 7 dias de infecção. Comparando os tempos de infecção obteve-se diferença estatisticamente significante ( $p<0,05$ ) no grupo *KO-IFN* do 7º para o 14º dia de infecção, no entanto no grupo WT percebe uma tendência a variação dos níveis desta citocina comparando os tempos de infecção ( $p=0,076$ ), não atingindo porém valores significativos.

Já a interleucina 5 (IL-5), cujos resultados estão expressos na figura 12, não apresentou valores estatisticamente significativos na comparação entre grupos. Percebe-se apenas tendência a variação no grupo WT com a comparação entre os tempos de infecção ( $p=0,076$ ), o mesmo ocorrendo na comparação entre os grupos WT e *KO-IFN* aos 14 dias de infecção, sobretudo não atingindo diferença estatística ( $p<0,05$ ).

A figura 13 mostra os resultados obtidos na dosagem de interleucina 13 (IL-13), cujos níveis apresentaram diferença estatisticamente significante ( $p<0,05$ ) entre os grupos controle e infectado no primeiro tempo experimental. Ainda no grupo de animais WT, considerando os

diferentes tempos, houve um aumento significativo nos níveis de IL-13 do sétimo para o décimo quarto dia após infecção. Quando comparados os grupos WT e *KO-IFN* também observou-se variação nos níveis de IL-13 com valores estatisticamente significantes ( $p<0,05$ ), em ambos os tempos experimentais.

Em relação à interleucina 10 (IL-10), a dosagem também não apresentou diferença estatisticamente significante na comparação entre os grupos (figura 14). Entretanto, percebe-se que há uma tendência a variação na comparação entre os tempos de infecção nos camundongos WT, com  $p=0,076$ ), apesar de não ser um valor estatisticamente significativo.

A figura 15 apresenta os resultados da dosagem de interleucina 17 (IL-17), onde é mostrada diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) nos níveis desta citocina produzidos pelos grupos WT e *KO-IFN* no 7º dia após infecção na comparação entre tempos, ocorre variação nos níveis dos camundongos WT ( $p=0,075$ ), porém não atingindo valores significativos.

Para interleucina 22 (IL-22) os resultados da figura 16 também apresentaram diferença estatisticamente significante ( $p<0,05$ ) na comparação dos tempos de infecção, porém nos animais do grupo WT. A dosagem desta citocina também variou comparando animais WT e *KO-IFN* mostrando diferença significativa aos 14 dias após infecção.

Na figura 17 a representação da dosagem de interleucina 21 (IL-21) mostra que houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) no grupo *KO-IFN* na comparação do grupo controle com o grupo infectado (14 dias após infecção) e também entre os animais com diferentes tempos de infecção (7 e 14 dias). Já na comparação entre animais WT e *KO-IFN* observou-se diferença estatística no 14º dia após infecção.

A dosagem dos níveis de interleucina 27 (IL-27), também não apresentou resultados estatisticamente significativos ( $p<0,05$ ) na comparação entre os grupos (figura 18).

#### 4.0 DISCUSSÃO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é um parasita intracelular facultativo e para o seu controle a resposta imune de caprinos, ovinos e murinos envolve tanto mecanismos da imunidade inata (JOLLY, 1965a) quanto da imunidade adaptativa (ELLIS *et al.*, 1991; PÉPIN *et al.*, 1991; PÉPIN *et al.*, 1997).

Considerando-se que nos mecanismos básicos desta patogênese em modelo murino, ocorre similaridade aos observados em pequenos ruminantes, ampla utilização do referido

modelo justifica-se por apresentar vantagens relacionadas à aquisição de reagentes específicos, o fácil manejo e, sobretudo, a existência de linhagens isogênicas, além de propiciar uma maior facilidade de comparação e de interpretação de resultados relativos a mecanismos básicos, com estudos de enfermidades humanas e de outros animais (CHORILLI *et al.*, 2007; RODRIGUES, 2009; VALE, 2005).

Neste contexto, os experimentos descritos foram desenvolvidos com o intuito de contribuir para o entendimento do padrão de resposta apresentado por camundongos C57Black/6 *KO-IFN* ao longo da infecção experimental por *C. pseudotuberculosis*, num modelo onde os mecanismos básicos de patogênese pelo microrganismo em questão são similares ao observado em pequenos ruminantes.

Analizando os resultados obtidos em nossos estudos verificamos o progresso da infecção intraperitoneal dos camundongos C57Black/6 por *C. pseudotuberculosis* através de cultivos da suspensão do linfonodo mesentérico dos animais infectados, monitorada pela presença e quantificação de bactérias determinadas por UFC, que revelaram um crescimento microbiológico elevado na primeira semana de infecção diminuindo sensivelmente após o 14º dia de infecção, sugerindo que a fase inicial da doença, a resistência contra este patógeno, a resposta imune inata do hospedeiro não foi suficiente para eliminar a bactéria (Tabela 2). Assim sendo, os mecanismos efetores da imunidade adaptativa desenvolvidos mais tarde durante a infecção representam fatores relevantes no controle da disseminação de *C. pseudotuberculosis*.

Belchior *et al.* (2006) afirmam que a disseminação deste patógeno do linfonodo regional para outros órgãos e tecidos do hospedeiro depende da virulência da linhagem, da carga bacteriana infectante e higidez do animal. Nos casos de disseminação via linfo-hemática a bactéria atinge outros órgãos alvo incluindo pulmão, fígado, rins e encéfalo, determinando forma visceral grave da doença (MCKEAN *et al.*, 2007).

A enzima Fosfolipase D apresenta função determinante na fisiopatologia das corinebacterioses, visto que as membranas das células dos mamíferos são constituídas por grande quantidade de fosfolipídeos (BELCHIOR *et al.*, 2006). A ação de mediadores pró-inflamatórios como: calicreínas, bradicininas, histaminas, fator de necrose tecidual, óxido nítrico e prostaglandinas na cronicidade do processo induzirá a formação de piogranulomas e abscessos caseosos, característicos das infecções por actinomicetos, incluindo *C. pseudotuberculosis* (BOGDAN, *et al.*, 1997). A partir de uma semana após inoculação experimental, numerosos pequenos piogranulomas são formados que, em seguida, coalescem

dando origem a grandes áreas focais purulentas (FONTAINE, *et al.* 2006; MEYER *et al.*, 2005; SMITH, 2003; WILLIAMSON, 2001).

A partir da observação dos dados descritos nas tabelas 3 e 4 é possível obter, ao longo dos 14 dias de infecção por *C. pseudotuberculosis*, a correlação existente entre os grupos de animais controle e infectados (WT e *KO-IFN*) e a freqüência de granulomas nas diferentes regiões anatômicas destes, onde tem-se todos um acometimento generalizado dos animais *KO-IFN* infectados em detrimento dos demais grupos.

A ampla distribuição e número de granulomas evidenciado no grupo de animais nocauteados para IFN- $\gamma$  infectados, sugere uma relação entre a ausência desta citocina e o agravamento da doença, ao tempo em que demonstra o quanto efetiva pode ser a resposta imune do hospedeiro frente a este patógeno. De acordo com Vale (2005), a localização do granuloma depende principalmente da via de entrada do microorganismo. As células de defesa após fagocitarem *C. pseudotuberculosis* morrem devido aos lipídios da parede celular bacteriana (HARD, 1972; BATEY, 1986b), iniciando assim a formação dos granulomas, e a retenção destes patógenos dentro da cápsula fibrosa constitui um importante mecanismo de defesa, por limitar a disseminação do processo infeccioso (BATEY, 1986b).

Os resultados expressos na figura 1 mostram que na relação do peso baço /carcaça dos camundongos em estudo houve um aumento no peso do baço dos animais experimentalmente infectados por *C. pseudotuberculosis*, ao longo dos 14 dias, principalmente no grupo *KO-IFN* que apresentaram os maiores valores para esta relação. Estudos de Baird e Fontaine (2007) demonstraram que a inoculação experimental de *C. pseudotuberculosis* em camundongos confirmam que independentemente da localização da bactéria a disseminação ocorre por todo o organismo, livre ou no interior dos fagócitos, com predominância nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário (linfonodos, baço) além do rim, fígado, pulmões e intestinos.

A progressão da infecção com *C. pseudotuberculosis*, bem como a determinação do padrão de migração celular para a cavidade peritoneal dos camundongos C57Bl/6 WT e *KO-IFN* foi monitorada pela mensuração do quantitativo de células no lavado peritoneal por via automotizada. Assim, o número de células encontrado na cavidade peritoneal destes animais infectados mostra o quanto efetiva pode ser a resposta do hospedeiro frente à ação deste patógeno. Os dados deste trabalho demonstram variação na quantidade total de leucócitos do 7º ao 14º dia de infecção no grupo de camundongos *KO-IFN* com redução significativa dos valores. Por outro lado observa-se que os animais nocauteados para *IFN* apresentaram teor leucocitário maior que os camundongos WT aos 7 dias de infecção (figura 4). Sobretudo, a

migração de células circulantes para os tecidos (diapedese), é direcionada pela presença de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório.

No tecido, as células buscam remover o patógeno por meio de sua capacidade fagocitária, permitindo o reparo da lesão, sendo que na inflamação aguda as principais células são os neutrófilos e os macrófagos. Entretanto, permanência do agente lesivo leva à cronificação do processo inflamatório, sendo observada concomitância de destruição e reparo tecidual. Na inflamação crônica o tecido apresenta caracteristicamente um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (BILATE, 2007).

Adicionalmente, 7 dias após a infecção, a análise diferencial de células através do citoesfregaço demonstrou uma prevalência inicial de leucócitos polimorfonucleares (PMN) principalmente neutrófilos no lavado peritoneal de ambos os grupos de animais WT e *KO-IFN* infectados. Após 14 dias de infecção experimental, pôde-se observar além de neutrófilos, também um aumento de células mononucleares principalmente macrófagos tanto nos camundongos WT quanto nos animais *KO-IFN* infectados. Em ambos os casos se configurou diferença estatisticamente significante ( $p<0,05$ ) na comparação destes com o grupo controle. No entanto, a comparação entre grupos WT e *KO-IFN*, aos 7 dias, apresentou diferença estatística no número de linfócitos para os animais controles (não infectados) e de linfócitos, macrófagos e neutrófilos nos animais infectados. Aos 14 dias, porém, a mesma análise comparativa entre camundongos WT e *KO-IFN* mostrou diferença significativa apenas para os macrófagos. Entretanto, sempre em todas as situações em que estes grupos foram confrontados observou-se uma maior proliferação celular no grupo de animais nocauteados (figura 5).

Deste modo, os dados observados no presente trabalho sugerem que a presença de polimorfonucleares nos momentos iniciais da infecção esteja relacionada à resposta imune inespecífica, em seguida tende a progredir para uma resposta específica contra o patógeno. A diminuição de tais valores ao final do experimento pode ser explicada pela resolução do processo inflamatório. Esta cronologia está de acordo com os conhecimentos dos mecanismos inatos que são predominantes nos primeiros dias de infecção, gerando as condições para o desenvolvimento da resposta adaptativa. Entretanto, essas células após fagocitarem *C. pseudotuberculosis* morrem devido aos lipídios da parede celular bacteriana (BATEY, 1986a; HARD, 1972), iniciando assim a formação dos granulomas. A retenção destes patógenos dentro da cápsula fibrosa constitui um importante mecanismo de defesa, por limitar a disseminação do processo infeccioso (BATEY, 1986c).

Seiler *et al.* (2003) demonstraram que, em camundongos C57Bl/6 infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, no inicio da infecção, houve uma constituição que propicia a contenção da bactéria, com as células PMN tendo papel central na regulação do foco granulomatoso no pulmão para que este granuloma formado possa ter uma função de proteção ao longo do tempo.

A resposta imune humoral, apesar de não desempenhar papel principal na defesa do hospedeiro frente ao *C. pseudotuberculosis*, uma vez que isoladamente não é capaz de eliminar a infecção causada por este patógeno, exerce função auxiliar na ativação do sistema imune sendo de extrema importância quando associada à resposta imune celular (MUCKLE *et al.*, 1992; VALE *et al.*, 2003). Esses anticorpos não interferem com a multiplicação do microrganismo, mas são capazes de impedir a disseminação da infecção do local de inoculação para órgãos internos (MACHADO, 2004).

Neste estudo os níveis de anticorpos IgG e subclasses contra *C. pseudotuberculosis* no soro, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na comparação entre grupos controle e infectados tanto para animais WT quanto para animais *KO-IFN* em ambos os tempos de infecção. Todavia, estes achados estão de acordo com os resultados de Vale (2005), onde os níveis de IgG3 não se alteram ao longo do tempo, e IgG1, IgG2a e IgG2b, se elevam com o tempo, mas só apresentam níveis expressivamente consideráveis a partir dos 30 dias de experimentação. Adicionalmente, estudos de Paule *et al.* (2003) avaliando a resposta imune humoral observou uma resposta primária de curta duração no 5º dia com uma mudança deste quadro a partir do 16º dia, numa forte resposta secundária e de longa duração. Assim sendo, ausência de expressão desses anticorpos pode estar relacionada à precocidade da dosagem aos 7 e 14 dias de infecção experimental (figuras 4 e 5).

Para melhor compreender o fenômeno de mobilização linfocitária e sua relação na defesa do organismo durante a infecção bacteriana, avaliamos quantitativamente as células do macerado do baço, através da citometria de fluxo, empregando anticorpos específicos para a determinação das subpopulações linfocitárias. De acordo com Lan *et al.* (1998) as infecções causadas por bactérias intracelulares facultativas está relacionada às células TCD4 e mais especificamente aos clones Th1 pelo aumento da atividade microbicida dos macrófagos pela produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sendo que o papel das células T CD8 está relacionada à capacidade de produzir IFN- $\gamma$  e à lise de células infectadas. Assim, os achados da citometria mostraram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para expressão de linfócitos T CD4 presentes na suspensão do homogenato do baço no 7º dia de infecção no grupo de animais WT sendo que estes foram mais expressos nos camundongos infectados que nos controle. Já no 14º dia, a

expressão de linfócitos T CD8+ mostraram variação estatística também com maior expressão nos camundongos infectados. Todavia, para o grupo de animais *KO-IFN* não ocorre diferença estatisticamente significante na expressão linfocitária para esta comparação entre animais infectados e controle, em nenhum dos tempos de infecção (figura 6). Quando comparados os dois grupos de animais WT e *KO-IFN* percebe-se que só há diferença estatística aos 14 dias de infecção na expressão de linfócitos T CD4 mais prevalente nos animais WT que nos *KO-IFN* (figura 6). Estes resultados estão em concordância com Pépin *et al.* (1994) que afirmam existir uma prevalência de linfócitos T CD4 na lesões imaturas e de células T CD8 e T $\gamma\delta$  em lesões maduras.

Lan *et al.* (1998) mostraram em camundongos, que ambas as populações de linfócitos são importantes no processo de resistência a *C. pseudotuberculosis* quando administraram anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 e observaram que aumentava a letalidade de camundongos e havia uma redução na produção de interferon- $\gamma$ .

Durante a persistência intracelular, proteínas microbianas são produzidas e apresentadas, promovendo assim a ativação de células T (KAUFFMAN, 1993). Segundo Denis (1991) em estudo com *mycobacteria* a resposta imune adaptativa começa quando linfócitos T reconhecem os抗ígenos micobacterianos associados às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e apresentados pelas células infectadas. Consequentemente, estes linfócitos ativados liberam citocinas que vão atrair células inflamatórias e ativar macrófagos (DENIS, 1991). Dentro dos macrófagos bactérias intracelulares podem estimular tanto as células T CD4+ através da expressão de抗ígeno associado ao MHC classe II, como também células T CD8+ através da expressão de抗ígenos associados a moléculas do MHC classe I. A ativação de células T CD4+ leva à secreção de IFN- $\gamma$ , que ativa macrófagos, à produção aumentada de óxido nítrico e destruição da bactéria. As células T CD8+ participam do mecanismo de defesa através da citotoxicidade, destruindo os macrófagos infectados (MACHADO *et al.*, 2004).

Pépin *et al.* (1994) observaram que há mais linfócitos T CD8 mostrando que essa população de linfócitos está relacionada com a atividade efetora e citotóxica, para conter a disseminação de macrófagos infectados.

No contexto imunológico, os dois maiores subtipos de linfócito T CD4+, T auxiliador do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2), produzem diferentes padrões de citocinas apresentando papéis distintos na resposta imunológica. Assim, células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-8, IL-12, e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1); enquanto células Th2 secretam preferencialmente

citocinas consideradas antiinflamatórias como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (CHER e MOSMANN, 1987; ELSE e FINKELMAN, 1998). Contudo, estas citocinas Th1 e Th2 atuam como sinais imunorregulatórios para geração de resposta imune mediada por células e anticorpos, respectivamente (WIKEL, 1996). E é o balanço entre estes perfis que define o estabelecimento de um ambiente pró ou antiinflamatório.

Dentre as citocinas classificadas como pró-inflamatórias, tem-se IFN- $\gamma$ , por ser secretado principalmente por linfócitos T citotóxicos e linfócitos T auxiliares ativados além de ser um potente ativador de macrófagos, portanto relacionados à indução e ativação da resposta imunológica adquirida e da resposta inflamatória aguda. Neste experimento, contudo sua dosagem não se fez necessária visto que estamos estabelecendo comparação com um grupo de animais *knockout* para esta citocina.

Os valores médios de intensidade de fluorescência (MIF) das principais citocinas relacionadas à patogênese de *C. pseudotuberculosis* mensurados por citometria de fluxo mostraram que a produção de TNF- $\alpha$  teve diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ) entre os grupos WT e *KO-IFN* no 14º dia de infecção, sendo que nos camundongos WT observa-se maiores níveis (figura 7). De acordo com Zganiac *et. al.* (2004) TNF- $\alpha$  controla a ativação da resposta Th1, suprimindo a proliferação de células Th1 CD4 e CD8 evitando com isso a desintegração de granulomas e destruição tecidual.

Assim, os estudos dos perfis de citocinas mostraram a enorme importância daquelas com ação pró-inflamatória, como o TNF- $\alpha$ , sobretudo no local de início da infecção (ELLIS *et al.*, 1991; PÉPIN *et al.*, 1997). O TNF- $\alpha$  teria papel crucial na fase inicial da infecção (LAN *et al.*, 1998, 1999). Estudos realizados por Pépin *et al.*, 1997, esclareceram também a ligação entre a formação de granulomas e expressão de algumas citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 e MCP-1) as quais têm papel nos mecanismos que impedem a disseminação do parasita.

Para Lan *et al.* (1998) o uso de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IFN $\gamma$  em camundongos, leva a disseminação deste microrganismo no hospedeiro, resultando na morte desses animais. Fortune *et al.* (2004) relataram à importância do IFN- $\gamma$ , da IL-12 e TNF- $\alpha$  no controle da infecção micobacteriana em humanos e em camundongos. Sobretudo, dentre os mediadores pró-inflamatórios o TNF- $\alpha$  é considerado o mediador mais importante na geração da resposta inflamatória, assim incluímos a mensuração do TNF- $\alpha$  neste experimento conforme descrito no método.

Neste estudo, a dosagem de IL-2 variou no grupo de animais WT quanto ao tempo de infecção mostrando um sensível aumento no segundo tempo analisado, bem como também na comparação deste grupo com os animais *KO-IFN*, onde observou-se diferença estatística ( $p<0,05$ ) entre os animais infectados aos 7 dias com maior produção dos animais nocauteados (figura 8). Considerando-se que esta citocina é produzida pelas células T CD4+ e em menor quantidade pelos, pelas células T CD8+, deve-se salientar que a IL-2 além de atuar como um fator de crescimento autócrino sobre estas células, também estimula o crescimento de células NK, facilitando sua ação citolítica o que se faz importante na contenção da infecção por *C. pseudotuberculosis*. Estudos realizados por Pépin *et al.* (1997), esclareceram também a ligação entre a formação de granulomas e expressão IL-2, bem como de outras citocinas que têm papel nos mecanismos que impedem a disseminação do parasita.

Os níveis de IL-1 $\alpha$  também variaram significativamente no grupo de camundongos *KO-IFN*, mostrando um aumento dos seus níveis nos animais infectados do sétimo ao décimo quarto dia de infecção (figura 9). Ciarlini *et al.* (1994) estudando caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis* afirmaram que a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o TNF- $\alpha$  são importantes citocinas liberadas na circulação que alcançam o fígado e induzem a síntese e liberação das proteínas de fase aguda. Estas proteínas de fase aguda funcionam como indicadores de doenças nos estágios iniciais da inflamação. Essa resposta inflamatória para o tecido lesado é um mecanismo fundamental, no qual o organismo monta uma defesa contra a lesão e inicia uma série de eventos químicos para desencadear o processo de cura. Estes eventos químicos são mediados pela liberação de citocinas pelos leucócitos que migram para o local da lesão.

Para IL-4 tem-se variação estatística na comparação dos níveis produzidos por camundongos WT e KO-IFN aos 7 dias de infecção com maior produção dos animais nocauteados, sendo que este nível diminui até o 14º de infecção experimental também com diferença significativa ( $p<0,05$ ) (figura 11). No entanto para IL-5 não houve diferença significativa nos níveis dos grupos analisados (figura 12) e na produção de IL-6 os níveis estatisticamente variáveis foram apenas na comparação entre grupos WT e *KO-IFN* aos 14 dias de infecção com maior produção dos animais WT (figura 10). A relação entre citocinas produzidas pelas células T CD4+ com o desenvolvimento do granuloma e a persistência da bactéria no hospedeiro foi sugerida por Pépin *et al.* (1991), que observaram uma grande produção de IFN- $\gamma$  e baixa produção de IL-4.

Nossos resultados com baixos níveis de IL-4, citocina típica do padrão Th2, produzidos pelos camundongos *KO-IFN* estão perfeitamente de acordo com dados

amplamente registrados na literatura, que demonstram ser o perfil de resposta predominantemente Th1, aquele responsável pela eliminação de bactérias intracelulares (FORTUNE *et al.*, 2004; TRAJKOVIE *et al.*, 2004). Assim sendo, os maiores níveis de IL-4 no grupo de animais *KO-IFN* pode está relacionado à ausência de interferon gama nestes animais devido ao caráter antagonista da atividade destas citocinas na infecção por *C. pseudotuberculosis*.

A IL-4 induz células T virgens após estímulo antigênico, a se desenvolverem em células capazes de produzir mais IL-4 e uma série de outras citocinas anti-inflamatórias e/ou regulatórias, incluindo IL-5, IL-10 e IL-13, bem como suprime o aparecimento de células T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$ , podendo promover em alguns casos a sobrevivência de patógenos por limitar a ativação de macrófagos (NELMS *et. al.*, 1999; HESS, 2001). Além disto, a IL-4 induz a proliferação de células B ativadas, células T, timócitos e clones de células NK (PENE *et. al.*, 1988).

A IL-6 é uma citocina sintetizada pelos fagócitos, células endoteliais, fibroblastos, células T ativadas e outras células em resposta a IL-1 e TNF- $\alpha$ . A mensuração da interleucina-6 mostrou a influência do processo de infecção por *C. pseudotuberculosis* na sua ativação pelo sistema imune, visto que, as elevações nos níveis desta citocina mostraram-se maiores no grupo *KO-IFN* infectado, sendo estatisticamente significante no 14º dia de infecção.

Com relação à dosagem de IL-13 no grupo de animais WT ocorreu variação entre animais controle e com 7 dias de infecção onde observamos maiores níveis nos controle. Também visualizamos diferença na produção desta citocina entre os tempos de infecção, onde percebe-se um aumento considerável em seus níveis com o passar do tempo. Já comparação de grupos WT e KO-IFN mostrou um aumento de produção aos 7 dias seguido de declínio aos 14 dias de infecção com valores estatisticamente significativos ( $p<0,05$ ) (figura 13).

Por sua vez quando analisamos os níveis do mediador antiinflamatório IL-10, o qual é produzido pelos monócitos, linfócitos B ativados e linfócitos T auxiliar e citotóxico, observa-se que não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes, na comparação dos grupos analisados, o que pode estar relacionado à baixa sensibilidade do kit Flow Cytomix Multiplex utilizado para este mediador não permitindo distinguir as diferenças entre os grupos testados (figura 14). O mesmo ocorre com a dosagem de IL-27 (figura 18).

Estudos relativamente recentes têm evidências sugerindo o envolvimento de IL-12 (p40), IL-23 e IL-27 na defesa do hospedeiro contra infecções causada por *Mycobacterium tuberculosis*. IL-27 parece ter propriedades biológicas similares a IL-12, que incluem potencialização da produção de IFN- $\gamma$  por células NK e células T (KAWAKAMI *et al.*, 2004).

Quando presentes durante a estimulação primária de células T CD4 naïve, IL-27 aumenta a proliferação e promove a diferenciação em células T efetoras Th1 que secretam IFN-gama. Entretanto, embora possa aumentar a produção de IFN- $\alpha$  por Células T CD4+, estudos demonstram que a IL-27 não é necessário para a manutenção do perfil Th1. (VILLARINO *et al.*, 2006). Assim, apesar da IL-27 ser incapaz de direcionar a produção IFN $\gamma$  por conta própria, ela desempenha um papel importante nas etapas iniciais do perfil Th1, contribuindo de forma parácrina para o controle da capacidade de resposta da IL-12 (LUCAS *et al.*, 2003)

A produção de IFN- $\gamma$  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. Além de IFN- $\gamma$  a IL-12 também é capaz de induzir a secreção de IL-10 pela mesma célula T (POHL-KOPPE *et al.*, 1998).

A análise dos níveis de IL-17 mostrou variação significativa ( $p<0,05$ ) logo no 7º dia de infecção, onde se observou um aumento sensível nos níveis desta citocina dos animais WT para os *KO-IFN* (figura 15).

Para IL-22 (figura 16) houve diferença nos níveis desta citocina nos camundongos WT infectados com um aumento sensível do 7º para o 14º dias de infecção. Porém, entre animais WT e KO-IFN ocorre diferença nos níveis desta citocina aos 14 dias de infecção, com menor teor nos animais nocauteados. Produzidas principalmente por células Th1 ativadas, IL-22 inibe a produção de IL-4 pelas células Th2.

Já os níveis de IL-21 mostraram diferença estatística entre animais WT e KO-IFN no segundo tempo de infecção, sendo que o grupo WT apresentou os maiores níveis. Na comparação entre animais controle e infectados houve variação na produção desta citocina pelos animais infectados com 14 dias no grupo KO-IFN que apresentaram menores níveis de IL-21. Porém, considerando apenas animais infectados neste mesmo grupo knockout percebe-se que há um decaimento na produção desta citocina do 7º ao 14 dia de infecção (figura 17), em ambos os casos com diferença estatística ( $p<0,05$ ). A IL-21, produzida pelas células T CD4+ ativadas, tem capacidade de aumentar a proliferação de células T, coordenar a diferenciação de células B e aumentar a atividade citotóxica de células NK, podendo ainda apresentar efeito autócrino na proliferação de células T CD 4+ e CD 8+ o que parece aumentar a resposta auxiliar Th1 e a atividade de linfócitos T citotóxicos (LEONARD *et al.*, 2005).

As principais fontes de IL-22 são células T ativadas e células NK, sendo que a polarização de células T para um fenótipo tipo Th1 aumenta ainda mais a expressão de IL-22,

enquanto que a polarização em direção ao tipo Th2 ou o fenótipo regulador reduz, sendo a mais alta expressão de IL-22 detectada em células CD4 + de memória. (Wolk et al., 2002).

O IFN- $\gamma$ , característico de células Th1, pode estar envolvido na proteção à patógenos intracelulares (BARNES *et al.*, 1993). Ao contrário células Th2, as quais produzem IL-4, IL-10, IL-13 e IL-5 apresentam uma menor importância na imunidade protetora contra patógenos intracelulares (KAUFMANN, 1993).

## 5.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos inferir que a evolução da infecção mostrou que a disseminação bacteriana ocorreu mais ativamente nos animais *KO-IFN* infectados que nos controles. Nestes observou-se os maiores quantitativos de recuperação bacteriana através da contagem de UFC na cultura de linfonodo, provavelmente devido à maior susceptibilidade destes animais a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

A maior frequência de granulomas verificada nos camundongos *KO-IFN* aos 14 dias de infecção, principalmente nos linfonodos, pode estar relacionada com uma tentativa compensatória do hospedeiro de conter a infecção na ausência de IFN- $\gamma$ .

O aumento crescente verificado no peso do baço dos animais *KO-IFN* infectados quando comparado aos animais WT, sugere um maior aporte celular para este órgão na tentativa de conter a infecção na ausência de IFN- $\gamma$ .

A produção de IgG e subclasses 14 dias pós infecção por *C. pseudotuberculosis* foi semelhante nos animais *KO-IFN* e WT, o que sugere uma resposta humoral tardia por esse tipo de anticorpo para esse microorganismo.

O maior teor de células no infiltrado peritoneal de camundongos *KO-IFN* infectados, principalmente neutrófilos e macrófagos, sugere um mecanismo compensatório inato para a contenção do crescimento bacteriano na ausência de IFN- $\gamma$ .

Observou-se que houve um predomínio de linfócitos T CD8+ nas células esplênicas de ambos os grupos WT e *KO-IFN*, o que sugere a importância dessa sub-população de linfócitos T na resposta imune contra esse microorganismo intracelular.

O balanço de citocinas demonstrou uma aumento da expressão de citocinas consideradas do perfil Th 1 no decorrer do processo infeccioso em ambos os grupos de camundongos WT e *KO-IFN*, sugerindo a indução de uma resposta satisfatória na resistência a bactérias intracelulares facultativas.

Na comparação entre animais WT e KO-IFN infectados observou-se que a expressão pelas células esplênicas de citocinas do perfil Th2/Th17 foi significativamente maior nos animais nocauteados, provavelmente por uma incapacidade de estabelecer uma resposta inflamatória eficiente na ausência de IFN- $\gamma$ .

### **Agradecimentos**

Este estudo teve apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

## REFERÊNCIAS

- [1] ABBAS, A.K.; LINCHTMAN, A.H.; PROBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 6<sup>a</sup> edição. São Paulo: Elsevier, 2008.
- [2] BATEY, R. G. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. **Vet. Microbiol.**, v. 11, n. 1-2, p. 145-152, 1986a
- [3] BATEY, R.G. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at a Western Australian abattoir. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 482-485, 1986b.
- [4] BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Aust. Vet. J.**, n. 63, p. 269-272, 1986c.
- [5] BELCHIOR SE, GALLARDO A, ABALOS A, JODOR N, JENSEN O. Actualizacion sobre linfoadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Rev Vet Argent.**, v. 23, p. 258-8, 2006.
- [6] BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M. *et al.* Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.749, 1997.
- [7] CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.
- [8] DORELLA, F. A. ; ESTEVAM, E. M. ; PACHECO, L. G. ; GUIMARAES, C. T. ; LANA, U. G. ; BARSANTE, M. M. ; OLIVEIRA, S. C. ; Meyer, R. ; Mioshy, A. ; AZEVEDO, V. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7368-7372, 2006a.
- [9] EHLERS, S.; BENINI, J.; HELD, H. D.; ROECK, C.; ALBER, G.; UHLIG, S. T Cell Receptor – positive cells and interferon- $\gamma$ , 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.
- [10] ELLIS,J.A., LAIMORE, M.D., O'TOOLE,D.T.,CAMPOS,M. Differential induction of tumor necrosis factor alpha in ovine pulmonary alveolar macrophagos following infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella haemolytica*,or Lentiviruses. **Infection and Immunity**, 3254-3260, 1991.
- [11] HARD, G.C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. **Infect. Immun.**, v. 12, p. 1439-1449, 1972.
- [12] KAWAKAMI, K., *et al.* Interferon-gamma production and host protective response against Mycobacterium tuberculosis in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. **Microbes Infect.** v.6(4): p. 339-49, 2004.
- [13] KAUFMANN, S.H. CD8 $^{+}$  T lymphocytes in intracellular microbial infections. **Immunol. Today**, v. 9, p. 168-189, 1988.
- [14] LAN, D.T.B. ; TANIGUHI, S.; MAKINO, S. *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.
- [15] LAN, D.T.B; MAKINO, S.I; SHIRAHATA, T., *et al.* Tumor necrosis factor alpha and gama interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 11, p. 1203-1208, 1999.
- [16] LEONARD, W.J., *et al.* Interleukina-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. **Nat Rev Immunol.**, v. 5, p. 688-698, 2005.
- [17] LUCAS, S., *et al.* IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naïve CD4T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. **Immunology**, v.100, p. 15047–15052, 2003

- [18] MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. RJ. v. 79 (6), p. 647- 664, 2004.
- [19] McKEAN S.C.; DAVIES J.K.; MOORE RJ. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: The major virulence factor, phospholipases D, is downregulated. **Res Microbiol**, v.158, p. 279-86, 2007.
- [20] MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis e o hospedeiro caprino*: aspectos da prevalência, do diagnóstico e da imunidade. 2004. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.
- [21] MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V., *et al*. In vitro IFN-gama production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Vet. Immunol. And Immunopathology**. V.107, p.249-254, 2005.
- [22] MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 2, p. 206-208, 1982.
- [23] NELMS, K.; KEEGANC, A.D.; ZAMORANOC, J; RYAN, J.J.; PAUL, W.E. The IL-4 Receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 701-738, 1999.
- [24] PASCUAL-RAMOS C.; LAWSON, P. A.; FARROW, J. A. E. *et al*. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 45, p. 724-728, 1995.
- [25] PAULE B.J.A.; AZEVEDO V.; REGIS L.F.; CARMINETI R.; BAHIA C.R.; VALE V.L.C.; MOURA-COSTA L.F.; FREIRE S.M.; NASCIMENTO L.; SCAHER R.; GOES A.M. & MEYER R. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 96, p.129-139, 2003.
- [26] PENE, J., ROUSSET, F., BRIERE, F., CHRETIEN, I., PALIARD, X., BANCHER-EAU, J., SPITS, H. & DE VRIES, J.E. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-Y. **J. Immunol.** v.141, n.1218, 1988.
- [27] PÉPIN, M.; FONTAINE, J.J.; PARDON, P. *et al*. Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Vet. Microbiol.**, v. 29, p. 123-134, 1991.
- [28] PÉPIN, M.; PATON, M.; HODGSON, A. L. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Current Topics in Veterinary Research**, v. 1, p. 63-82, 1994.
- [29] PÉPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; ROTHEL, J.S.; HODGSON, A.L.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet Res.**, v. 28, p. 149163, 1997.
- [30] RODRIGUES, G. C. Papel de抗ígenos secretados de uma linhagem atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na indução de resposta imune em camundongos. **Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia**, 2009.
- [31] SEILER P, AICHELE P, BANDERMANN S, HAUSER AE, LU B, *et al*. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. **Eur J Immunol.**, v.33, p.2676–2686, 2003.
- [32] SEYFFERT, N. ; GUIMARÃES, A.S. ; PACHECO, L.G.C. ; PORTELA, R.W. ; BASTOS, B.L. ; DORELLA, F.A. ; HEINEMANN, M.B. ; LAGE, A.P. ; GOUVEIA, A.M.G. ; MEYER, R. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Research in **Veterinary Science**, p. 1-6, 2009.

[33] VALE, V. L. C. **Avaliação de aspectos da resposta imune de camundongos contra *C. pseudotuberculosis*.** Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia - UFBA. 2005.

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

## TABELAS E FIGURAS:

**Tabela 1** - Resultado do crescimento microbiológico para *C. pseudotuberculosis* por animal nos diferentes grupos.

ANIMAIS	GRUPO	TEMPO	UFC (C57BL6/WT)	UFC (C57BL6/KO)
1	I	7 dias	00	00
2	I	7 dias	00	00
3	I	14 dias	00	00
4	I	14 dias	00	00
5	II	7 dias	15	84
6	II	7 dias	08	317
7	II	7 dias	00	01
8	II	7 dias	00	10
9	II	7 dias	00	25
10	II	14 dias	00	00
11	II	14 dias	92	00
12	II	14 dias	00	00
13	II	14 dias	00	00
14	II	14 dias	00	00

I – Grupo controle; II – animais infectados; C57BL6/WT – camundongos selvagens; C57BL6/KO – camundongos *Knockout* IFN.

**Tabela 2** - Número (positivos/avaliados) de animais com crescimento microbiológico positivo para *C. pseudotuberculosis* na cultura da suspensão do linfonodo mesentérico.

TEMPOS/ GRUPOS	<i>Black WT</i> <i>Cont.</i>	<i>Black WT</i> <i>Infec.</i>	<i>Black KO</i> <i>Cont.</i>	<i>Black KO</i> <i>Infec.</i>
7 dias	00/02	02/05	00/02	05/05
14 dias	00/02	01/05	00/02	00/05
Total	00/04	03/10	00/04	05/10

- WT Camundongos C57Black/6 selvagens; KO - Camundongos C57Black/6 *Knockout* IFN;

**Tabela 3** – Presença de granulomas em variadas regiões anatômicas de camundongos infectados com *C. pseudotuberculosis*.

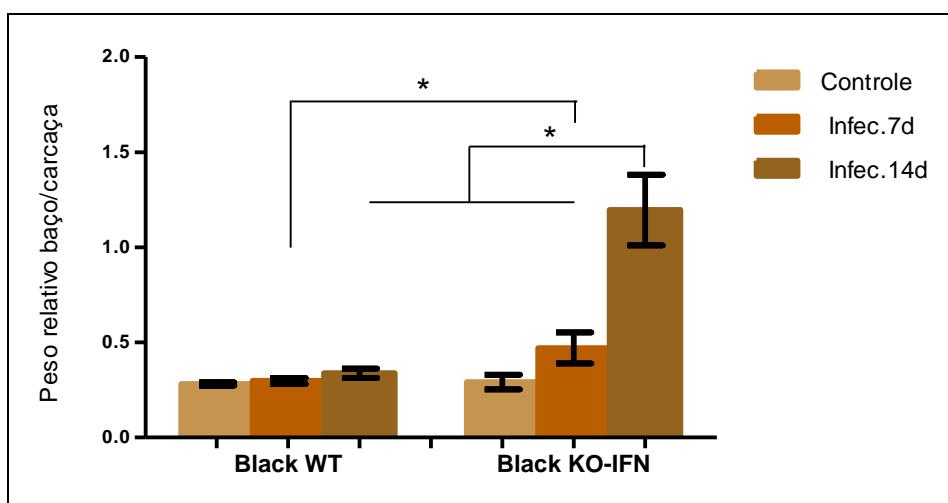
<b>Tempo</b>	<i>Black WT</i>	<i>Black WT</i>	<i>KO-IFN</i>	<i>KO-IFN</i>
	<i>Cont.</i>	<i>Infec.</i>	<i>Cont.</i>	<i>Infec.</i>
<b>07 dias</b>	00/02	00/05	00/02	00/05
<b>14 dias</b>	00/02	00/05	00/02	05/05
<b>TOTAL</b>	<b>00/04</b>	<b>00/10</b>	<b>00/04</b>	<b>05/10</b>

WT - Camundongos C57Black/6 selvagem; KO - Camundongos C57Black/6 *knockout IFN*;

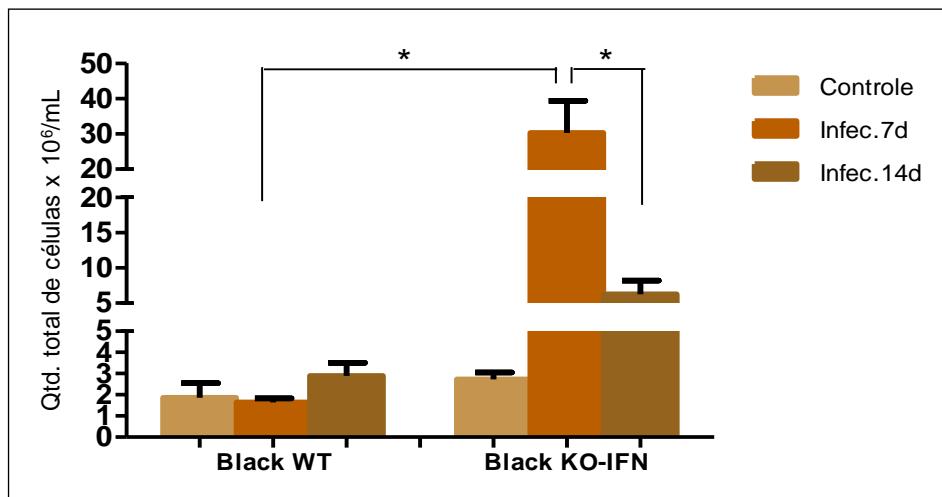
**Tabela 4** – Principais regiões anatômicas acometidas por granulomas nos animais C57Black/6 *KO- IFN*

<b>Região anatômica</b>	<b>KO- IFN</b> <i>Cont.</i>	<b>KO- IFN</b> <i>Infec.</i>
<b>Linfonodos</b>	00	14
<b>Cutâneo</b>	00	03
<b>Fígado</b>	00	01
<b>Rim</b>	00	02
<b>Pulmão</b>	00	01
<b>TOTAL</b>	<b>00</b>	<b>21</b>

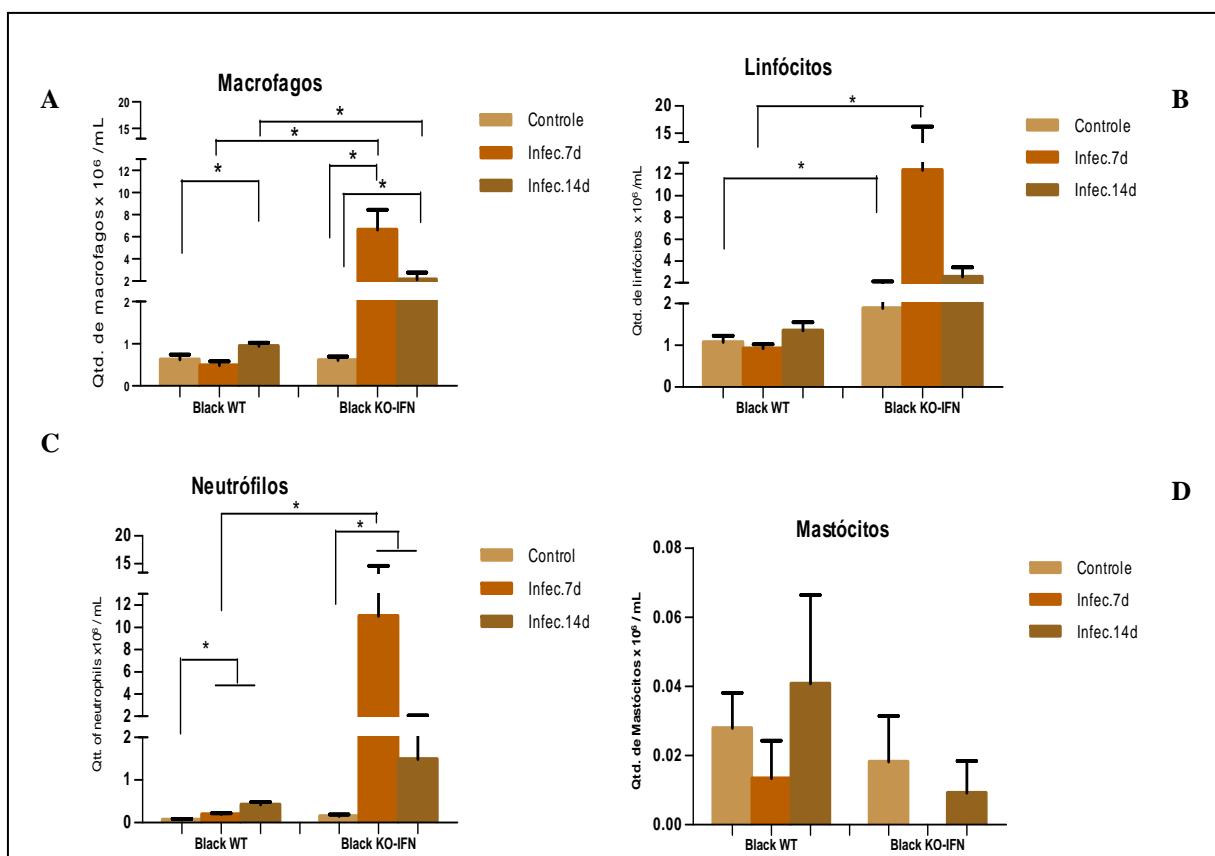
KO - Camundongos C57Black/6 *knockout IFN*



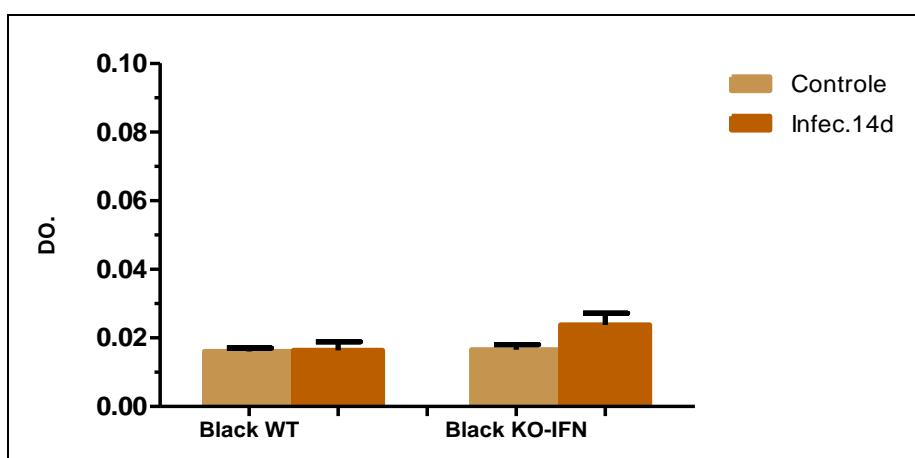
**Figura 1** – Relação do peso baço /carcaça de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 Knockout IFN (KO-IFN), nos tempos 07 e 14 dias após infecção com a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*. \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



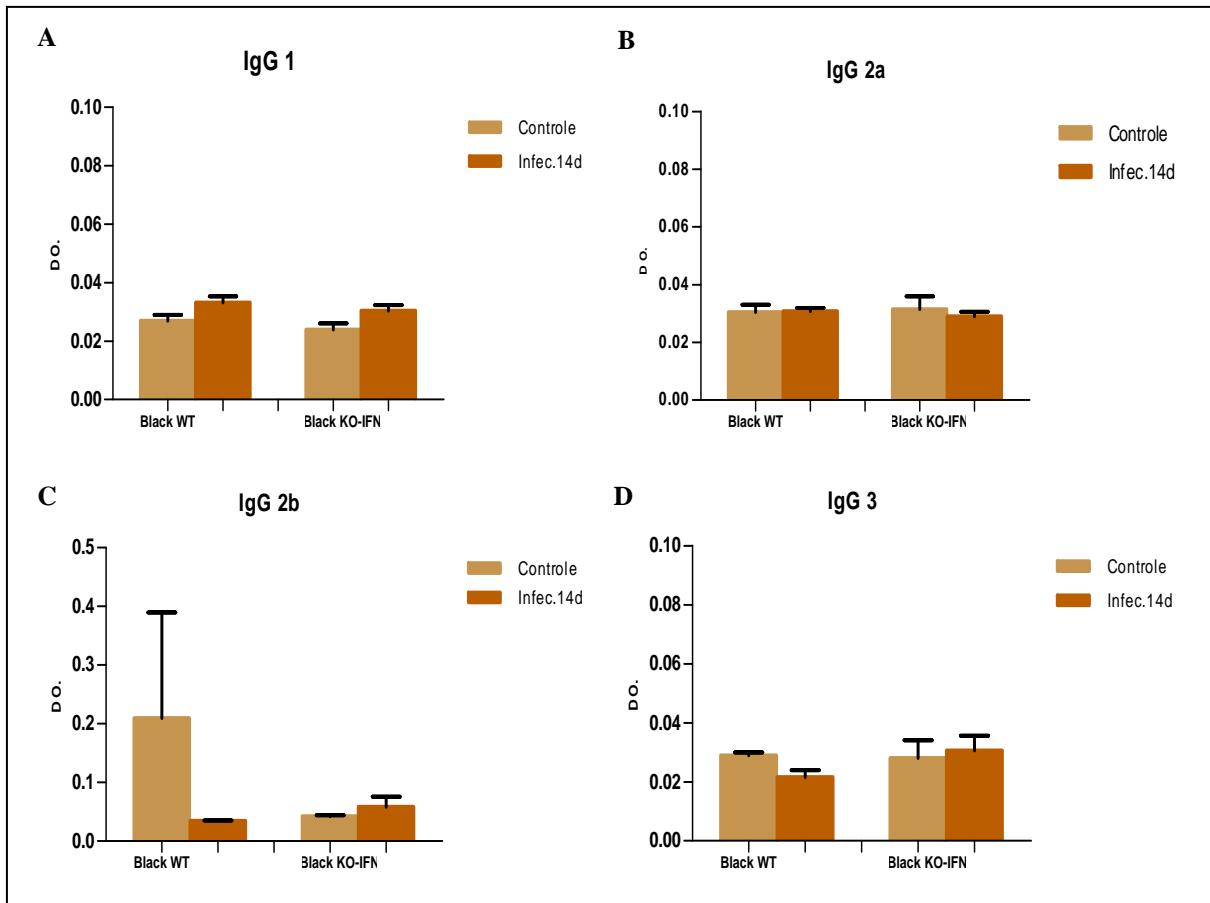
**Figura 2** - Determinação da quantidade leucocitária total no lavado peritoneal de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 Knockout IFN (KO-IFN), nos tempos 07 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*. \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



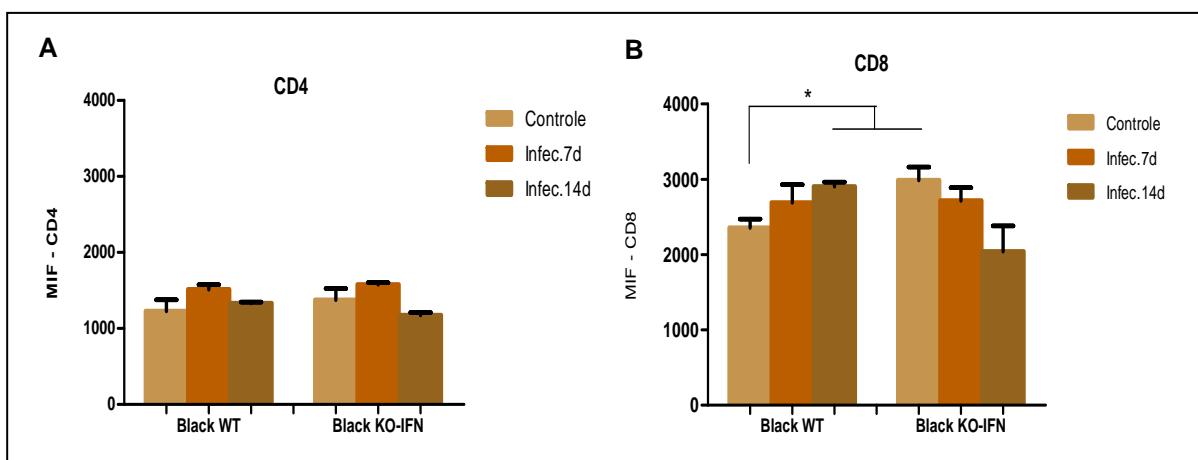
**Figura 3** - Determinação da contagem diferencial de células de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 knockout IFN (KO-IFN), nos tempos 07 e 14 dias após infecção com a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*. \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



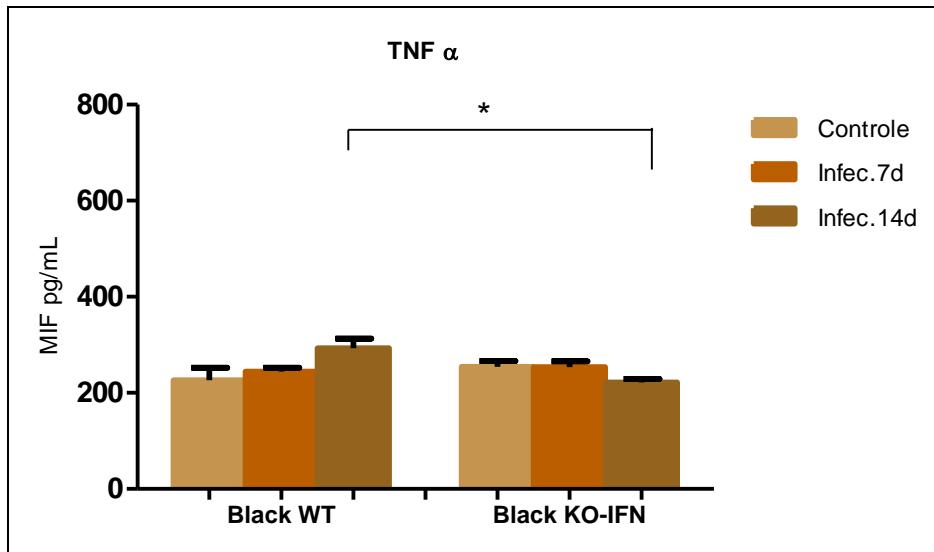
**Figura 4** - Cinética da produção de IgG por camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 Knockout IFN (KO-IFN), aos 14 dias após infecção com *C. pseudotuberculosis*. Valores obtidos por densidade óptica (DO). \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



**Figura 5** - Cinética da produção de subclasses de IgG por camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *knockout* IFN (KO-IFN), aos 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*. Valores obtidos por densidade óptica (DO). \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.

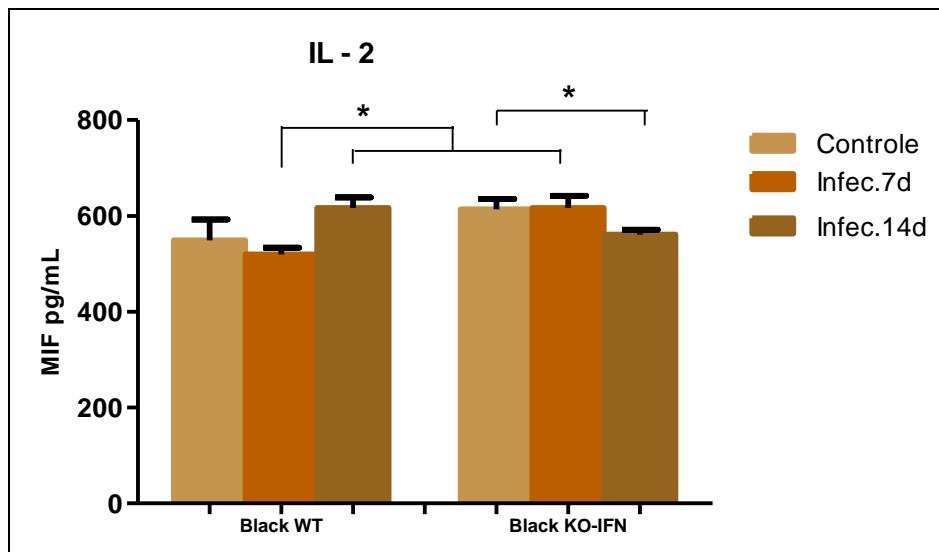


**Figura 6** - Determinação da média intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *knockout* IFN (KO-IFN), nos tempos 07 e 14 dias após infecção com a linhagem T1de *C. pseudotuberculosis*. \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



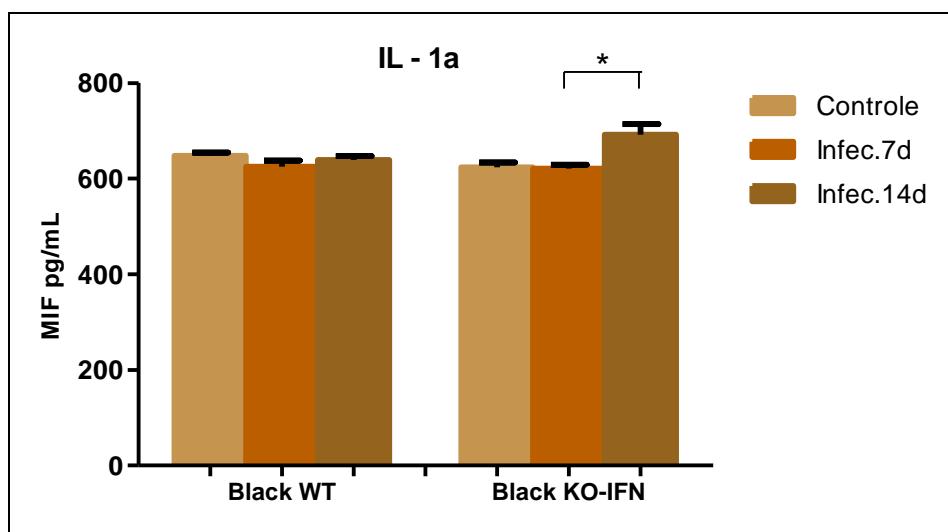
**Figura 7** - Produção de TNF-alfa por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.

\*Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.

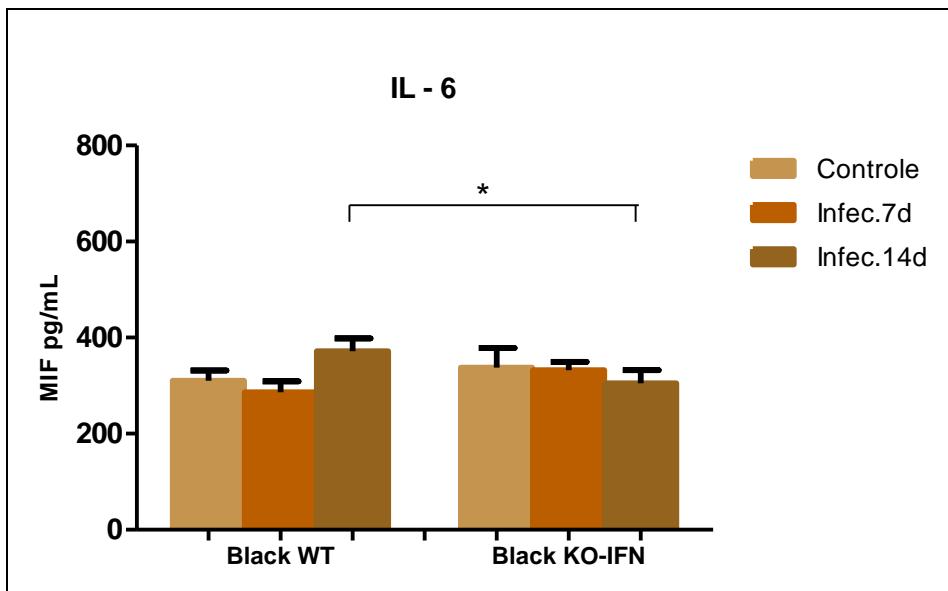


**Figura 8** - Produção de interleucina 2 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.

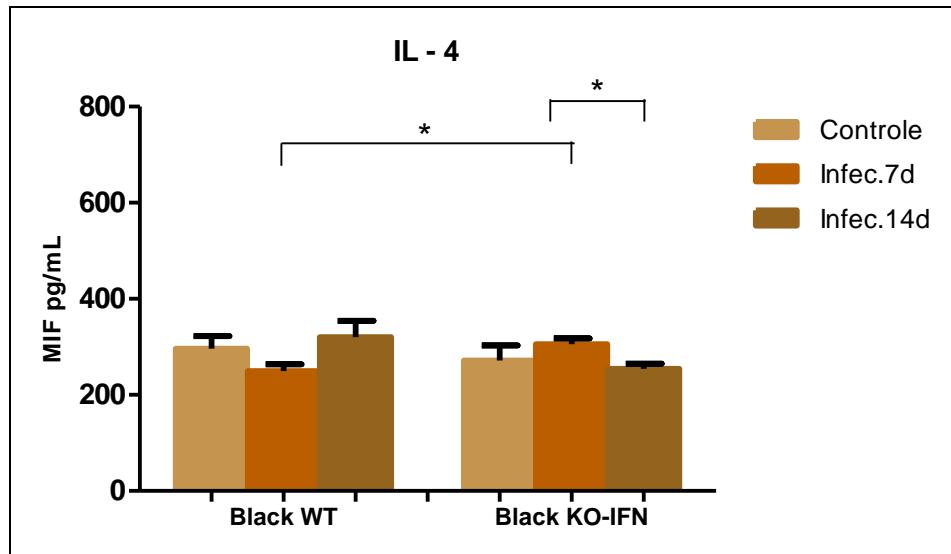
\* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



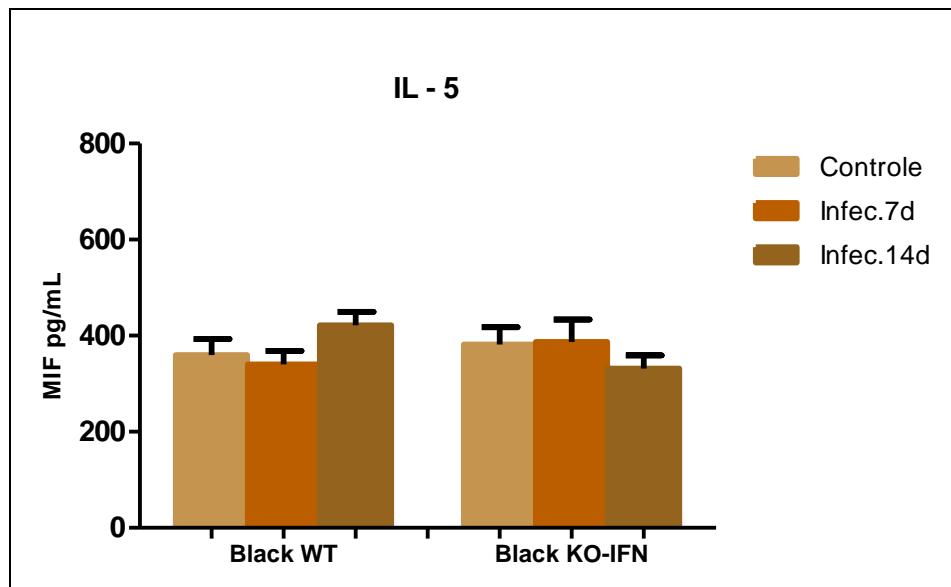
**Figura 9** - Produção de interleucina 1- $\alpha$  por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.  
 \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



**Figura10** – Produção de interleucina 4 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.  
 \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.

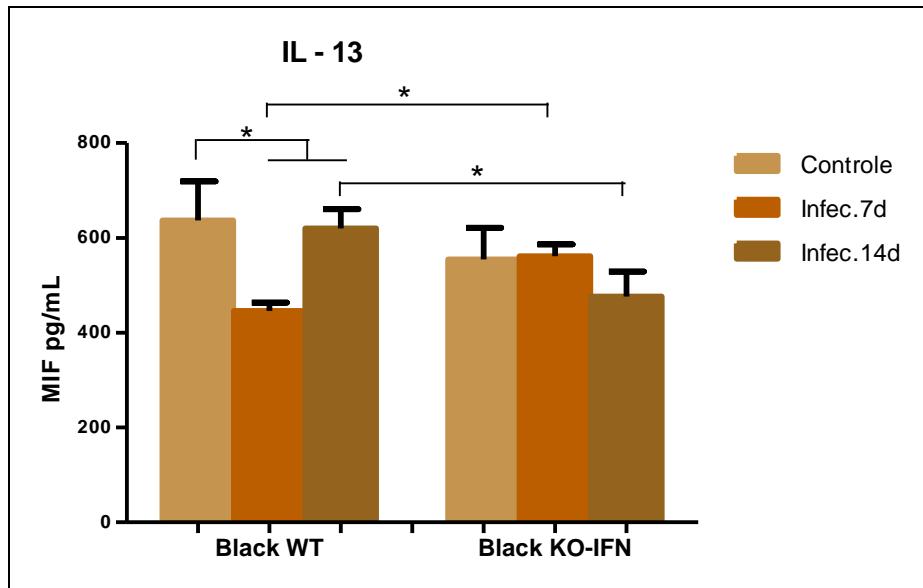


**Figura 11** – Produção de interleucina 4 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*. \* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.

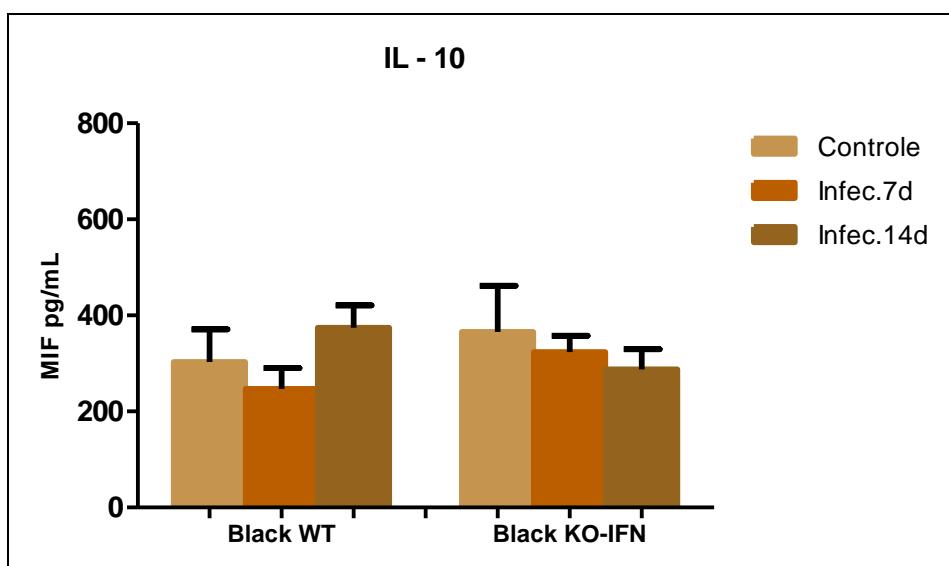


**Figura 12** – Produção de interleucina 5 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.

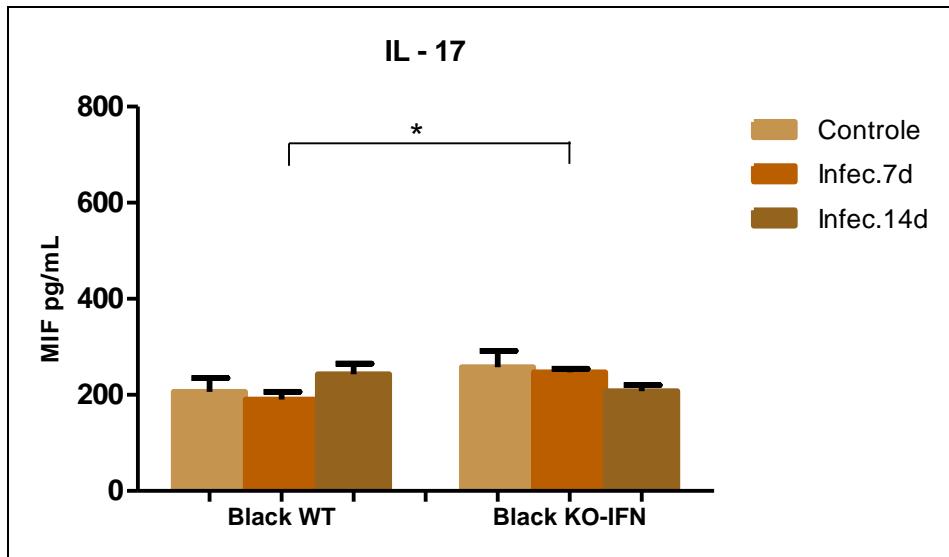
\* Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



**Figura 13** – Produção de interleucina 13 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*. \*Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.

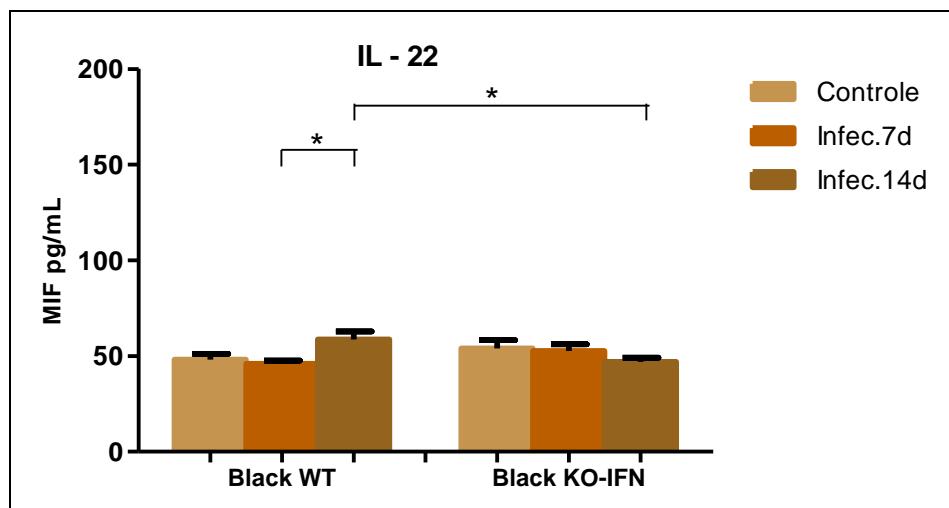


**Figura 14** – Produção de interleucina 10 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*. \*Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



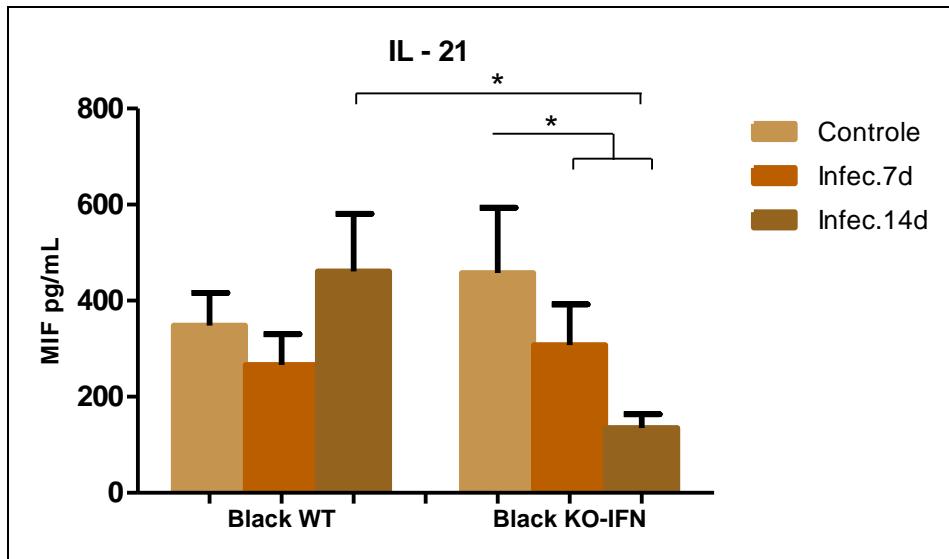
**Figura 15** – Produção de interleucina 17 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout IFN* (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.

\*Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



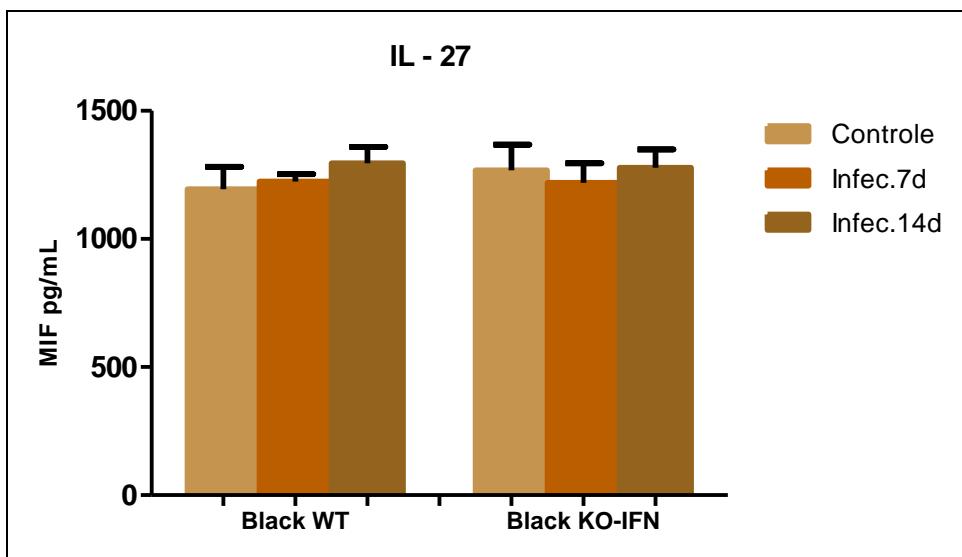
**Figura 16** – Produção de interleucina 22 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout IFN* (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.

\*Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



**Figura 17** – Produção de interleucina 21 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.

\*Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.



**Figura 18** – Produção de interleucina 27 por células esplênicas de camundongos C57Black/6 selvagem (WT) e C57Black/6 *Knockout* IFN (KO-IFN), 7 e 14 dias após infecção por *C. pseudotuberculosis*.

\*Representa a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LINCHTMAN, A.H.; PROBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 6<sup>a</sup> edição. São Paulo: Elsevier, 2008.
- ALEMAN, M. & SPIER, S.J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. In Large Animal Interna. **Medicine 3'D ed. Edited by Smith P.B. St Lpuis**: Mosby Co. p.1078-1084, 2001
- ALONSO, J.L.; SIMÓN, M.C.; GIRONES, O.; MUZQUIZ, J.L.; ORTEGA, C.; GARCÍA, J. The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* on reproduction in adult ewes. **Research in Veterinary Science**, v.52, p. 267-276, 1992.
- ALVES, F.S.F. **Immunokinetics of goats with *C. ovis* vaccination and infection**, 68 f. 1988. Dissertação de Mestrado em Patologia Comparada. University of California, Davis, 1988.
- ALVES, F. S. F. & OLANDER, H. Uso de vacina toxóide no controle da linfadenite caseosa em caprinos. **Veterinária Notícias**, v. 5, p. 69-75, 1999.
- ALVES, F.S.F. & PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas. **Sociedade Nacional de Agricultura**, ano 100, 1997.
- AL RAWASHDEH, O.F.; AL QUDAH, K.M. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, p. 287-293, 2000.
- ANDERSON, M.; NAIRN, M. E. Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. **Colloques de LINRA**, v. 28, p. 605-609, 1984.
- ANDERSON, D.E.; RINGS, D.M.; PUGH, D.G. Enfermidades do Sistema Tegumentar. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p. 232-233, 2005.
- ARSENAULT, J.O.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P., *et al.* Prevalence and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, **Prev. Vet. Med.**, v. 59, p. 67-81, 2003.
- ASHFAQ, M.K.; CAMPBELL, S.G. A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in the United States. **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, v. 74, p. 1161-1165, 1979.
- ASHFAQ, M.K.; CAMPBELL, S.G. Experimentally induced caseous lymphadenitis in goats. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, p. 1789-1792, 1980.
- AUGUSTINE, J.L.; RENSHAW, H.W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 713-715, 1986.

- BAIRD, G.J. & FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseus Lymphadenitis. **J. Comp. Path.**, v. 137, p. 179-210, 2007.
- BARKSDALE, L. "The genus *Corynebacterium* in the Prokaryotes", In: STARR, M. P.; STOLP, H.; TRUPER, H. G.; BALOWS, A.; SCHELEGEL, H. G. (Edits.) New York: Springer-Verlag, v. 2. 1981.
- BATEY, R.G. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. **Vet. Microbiol.**, v. 11, n. 1-2, p. 145-152, 1986a.
- BATEY, R.G. Frequency and consequence of caseous lymphadenitis in sheep and lambs slaughtered at a Western Australian abattoir. **Am. J. Vet. Res.**, v. 47, p. 482-485, 1986b.
- BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Aust. Vet. J.**, n. 63, p. 269-272, 1986c.
- BATTEY, Y.M.; TONGE, J. I. Human infection with *Corynebacterium ovis*. **The Medical Journal of Australia**, n. 2, p. 540-543, 28 Sept. 1968.
- BELCHIOR, S.E.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; JODOR, N.; JENSEN, O. Actualizacion sobre linfoadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Rev Vet Argent.**, v. 23, p. 258-8, 2006.
- BELKNAP, E.B. Enfermidades do Sistema Respiratório. In: PUGH, D.G. **Clinica de Ovinos e Caprinos**. São Paulo: ROCA, p. 141, 2004.
- BENHAM, C.L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **Commonwealth Bureau of Animal Health**, v. 32, p. 645-657, 1962.
- BERNHEIMER, A.W.; CAMPBELL, B. J.; FORRESTER, L.J. Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Science**, v. 228, p. 590-591, 1985.
- BIBERSTEIN, E.L.; KNIGHT, H.D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet. Rec.**, v. 89, p. 691-692, 1971.
- BILLINGTON, S.J.; ESMAY, P.A.; SONGER, J.G., et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 208, p. 41-45, 2002
- BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M., et al. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.749, 1997.
- BOGDAN, J.R.; NEWLANDS C.F.; ELLIS, J.A. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. **Vet Immunol Immunopathol.** v.56, p. 299-310, 1997.
- BRAITHWAITE, C.E.; SMITH, E.E.; SONGER, J.G., et al. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet. Microbiol.**, v. 38, p. 59-70, 1993.

BROWN, C.C. **Caseous Lymphadenitis of goats.** 1985. 83 f. (Doctor of Philosophy Thesis) - University of California, Davis, 1985.

BRUERE, A.N.; WEST, D. M. Caseous lymphadenitis. In: The Sheep: Health, Disease and Production. **Palmerston North: Massey University Press**, 1990.

BURMESTER, G. R.; PEZZUTO, A. **Color atlas of immunology.** Stuttgart: Thieme, 322 p., 2003.

BURRELL, D.H. Vaccination against caseous lymphadenitis in sheep. In: 55<sup>TH</sup> ANNUAL CONFERENCE AUSTRALIAN VETERINARY ASSOCIATION. **Proceedings...**, p. 79-81, 1978.

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

BURRELL, D.H. Caseous lymphadenitis in goats. **Australian Veterinary Journal**, v.57, n. 3, p. 105-110, 1981.

BUXTON, A. & FRASER, G. *Corynebacterium*. In: BUXTON, A. & FRASER, G. Animal Microbiology. **Edinburgh: Blackwell Scientific Publications**, p. 177-183, 1977.

Cabrera P.A., *et al.*, National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants Ovis aries as an indicator in control programmes in Uruguay. **Acta Trópica**, 85, p. 281-285, 2003.

CAMERON, C.M.; ENGELBRECHT, M. M. Mechanism of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Buchanan, 1911) in mice using inactivating vaccine. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 73-82, 1971.

CAMERON, C.M.; MINNAAR, J.L. Imunization of mice against *C. pseudotuberculosis* infection. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.36, p.207, 1969.

CAMERON, C.M.; SWART, C. F. A new liquid medium for the cultivation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v. 36, n. 2, p. 185-188, 1965.

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

CARMO, F.B., *et al.*, Soroprevalência da linfadenite caeosa em caprinos em propriedades no Estado do Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25. **Anais...**, p. 1, 2009.

CARNE, H.R. A bacteriology study of 134 strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 49, n. 2, p. 313, 1939.

CARNE, H.R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 51, n. 2, p. 199-212, 1940.

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

CETINKAYA B.; KARAHAN M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE T.; VENECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, V.88, p.75-83, 2002.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CHIRINO-ZARRAGA, C., SCARAMELLI, A.; REY VALEIRÓN, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in **Venezuelan goats flocks. Small Rumin Res.** No prelo. 2005.

COLLETT, M.G.; BATH, G.F.; CAMERON, C.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: **Infection diseases of livestock with special reference to Southern Africa**. Oxford University Pressv. 2, p. 1387-1395, 1994.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 843 p., 1992.

COYLE, M.B. & LIPSKY, B.A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 227-246, 1990.

CUBERO PABLO, M.J.; REAL VALCÁRCEL, F.; GONZÁLEZ CANDELA, M.; LEÓNVISCAÍNO, L. Epidemiología de la *pseudotuberculosis*. **Rev. Ovis**, <http://www.exopol.com/circulares/205.html>. 2002.

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

DORELLA, F.A.; FACHIN, M.S.; BILLAULT, A.; DIAS NETO, E.; SORAVITO, C.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; AZEVEDO, V. Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 653-663, 2006b.

DOVER, L.G.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M.; PALLEN, M.J., *et al.* Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *M. tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. **FEMS Microbiology Reviews.**, v.28, p.225-250, 2004.

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

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

EL-HASHEMITE, N.; ZHANG, H.; WALTER, V.; HOFFMEISTER, K.M.; KWIATKOWSKI, D.J. Perturbed IFN- $\gamma$ -JAK-STAT signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models. **Cancer Res.**, v.64, p. 3361-3375, 2004.

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

ELLIS, T.M.; SHUTHERLAND, S.S.; WILKINSON, F.C.; MERCY, A.R.; PATON, M.W. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. **Australian Veterinary Journal**, v.64, p. 261-263, 1987.

**FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations**, 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>. Acesso em: 13 jan. 2010.

FARIA, G.A.; MORAIS, O.R.; GUIMARAES, P.H.S. Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. Relatório técnico. 2004. Disponível em: <[www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere\\_para\\_crescer/geor/diagnostico/ovinocaprinocultura.pdf](http://www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovinocaprinocultura.pdf)>.

FARRAR, M.A.; SCHREIBER, R.D. The molecular cell biology de interferon- $\gamma$  and this receptor. **Anu Rev Immunol.** v. 11, p. 571-611, 1993.

FIGUEIREDO, E.A.P.; SHELTON, M.; PANT, K.P. **Goats skins**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., Tucson. **Proceedings...** Scottsdale: Dairy Goat Journal, p. 488-490, 1982.

FLYNN, J.L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J., *et al.* An essential role for Interferon  $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 2249-2254, 1993.

FONTAINE, M.C.; BAIRD, G.; CONNOR, K.M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep aganist infection with virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**. 2006; 24: 5986-96.

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

GALVANI, A.L.S.; KREBS, V.L.J.; VAZ, F.A.C. Biochemical characteristics and properties of the humoral mediators in bacterial infections. **Pediatria (São Paulo)**, v.21, p.123-132, 1999.

GARITY, S.; WINTERS, L.; SEARLES, W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2<sup>nd</sup> Edition, Internet, p.14, 2001.

GUIMARÃES, A.S., *et al.* Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, doi:10.1016/j.smallrumres.2009.09.027, 2009.

HARD, G.C. Electron Microscopic Examination of *Corynebacterium ovis*. **Journal of Bacteriology**, v. 97, n. 3, p. 1480-1485, 1969.

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

HARD, G.C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infec. Immun.**, v. 12, p. 1439-1449, 1975.

HEDDEN, J.A.; CYNTHIA, T.; SONGER, J.G.; OLSON, B.G. Characterization of lectin-binding lymphocytes in goat with caseous lymphadenitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47 (6), p.1265-1267, 1986.

HESS, M.; MODOLELL, M.; FLAMME, A.; SCHITO, M.; FUENTES, J.M.; CHEEVER, A.W.; PEARCE, E.J.; WYNN, T.A. 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. **The Journal of Immunology**, 2001

**IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Pesquisa Pecuária Municipal, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=23&i=P>>. Acesso em: 11 jan. 2011.

IONEDA, T.; SILVA, C. L. Purification of 1-monoacylglycerols containing alphabranched-beta-hydroxylated fatty acids from lipids of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 25, n. 1, p. 85-91, 1979.

IRWIN, M.R.; KNIGHT, H.D. Enhanced resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in levamisole-treated mice. **Infection and Immunity**, v. 12, p. 1098-1103, 1975.

JACOBS, M., *et al.* Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. **Microbes and infection** v. 9, p. 623 – 628, 2007.

JANEWAY, C.A.; TAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOLMCHI. **Imunologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença**. Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Moléstias Causadas por Bactérias. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole. p. 489-491, 2000.

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

- JOLLY, R.D. Experimental infection of convalescent mice with *Corynebacterium ovis*. **New Zealand Vet. J.**, v. 13, p. 148-153, 1965b.
- JOLLY, R.D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **J. Appl. Bact.**, v.29 (1), p.189-196, 1966.
- KADOWAKI, N.S.; ANTONENKO, J.Y.; LAU, Y.J.; LIU. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. **Journal Experimental Medical**. v. 192, p. 219-225, 2000.
- KAUFMANN, S.H. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in intracellular microbial infections. **Immunol. Today**, v. 9, p. 168-189, 1988.
- KIMBERLING, C.V. Caseous Lymphadenitis. In: **Jensen and Swift's Diseases of Sheep**. 3.ed. Philadelphia: Lea e Febiger. p. 374-377. 1988.
- KNIGHT, H.D. A serological method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **Cornell Veterinarian**, v. 68, n. 2, p. 220-237, 1978.
- KRISHNA, L.; KULSHRESTHA, S. B.; PALIWAL, O. P. Epididimo-Orchitis in ram due to *Corynebacterium ovis*. **Indian Veterinary Journal**, v. 54, n. 2, p. 517-519, 1977.
- LAN, D.T.B. ; TANIGUHI, S.; MAKINO, S. *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.
- LAN, D.T.B; MAKINO, S.I; SHIRAHATA, T. *et al.* Tumor necrosis factor alpha and gama interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 11, p. 1203-1208, 1999.
- LITERAK, I.; HORVATHOVA, A.; JAHNOVA, M.; RYCHLIK, I.; SKALKA, B. Phenotype and genome characteristics of the Slovak and Czech *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains isolated from sheep and goats. **Small Ruminant Research**. v.32, p.107-111, 1999.
- LIU, D.T.; CHAN, W.M.; FAN, D.S.; LAM, D.S. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 89, p. 245-246, 2005.
- LOPEZ, J.F.; WONG, F.M.; QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* first case of human infection. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 46, n. 5, p. 562-567, 1966.
- LUCAS, S. *et al.* IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naïve CD4T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. **Immunology**, v.100, p. 15047-15052, 2003
- MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. RJ. v. 79 (6), p. 647-664, 2004.

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

McKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.M; MOORE, R.J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: The major virulence factor, phospholipases D, is downregulated. **Res Microbiol**, v.158, p. 279-86, 2007.

McNAMARA, P.J.; BRADLEY, G.A.; SONGER, J.G. Targetted mutagenesis of the phospholipase D gen results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 12, p. 921-930, 1994.

MENZIES, P.I. Caseous lymphadenitis of sheep and goats. In Aiello S., Mays A. (eds): **The Merck Veterinary Manual, ed 8.** Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., p. 55-56, 1998.

MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. The Genus *Corynebacterium*. In: MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. **Veterinary Bacteriology and Virology**. Iowa: The Iowa State University Press, p. 425-440, 1967.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. **Bacteriología e Virología Veterinarias**. 3 ed. Zaragoza: Acribia, 1975.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R.B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCAER, R.; SILVA, J.A.H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, **R. Ci. Méd. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 42-48, nov.2002.

MEYER, R. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino:** aspectos da prevalência, do diagnóstico e da imunidade. 2004. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

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

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

MOLLER, K.; AGERHOLM, J.S.; AHRENS, P.; JENSEN, N.E.; NIELSEN, T.K. Abscess disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep. **J. Vet Med. B. Infect. Dis. Vet.Pub.Health**, v.47 (1), p. 55-62, 2000.

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

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

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

MOTTA, R.G.; CREMASCO, A.C.M.; RIBEIRO, M.G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Vet. e Zootec.**, v.17 (2), p. 200-213, 2010.

MUCKLE, C.A.; GYLES, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 2, p. 206-208, 1982.

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

NAIRN, M.E.; ROBERTSON, J.P. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep: role of skin lesions and dipping fluid. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 12, p. 537-342, 1974.

NELMS, K.; KEEGANC, A.D.; ZAMORANOC, J; RYAN, J.J.; PAUL, W.E. The IL-4 Receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 701-738, 1999.

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

NOCARD, E., **Annales d’Institut Pasteur**, v. 10, p. 609, 1896.

ONON, E.O. Purification and partial characterization of the toxin of *Corynebacterium ovis*. **Biochemical Journal**, v. 177, n. 1, p. 181-186, 1979.

PASCUAL-RAMOS, C.; LAWSON, P. A.; FARROW, J.A.E., *et al.* Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 45, p. 724-728, 1995.

PATON, M.W.; MERCY, A.R.; WILKINSON, F.C., *et al.* The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. **Austr. Vet. J.**, v. 65, p. 117-119, 1988.

PATON, M.W.; ROSE, I.R. HART, R.A.; SUTHERLAND, S.S.; MERCY, A.R., ELLIS, T.M.; DHALIWAL, J.A. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. **Aust. Vet. J.**, v. 71, p. 47-49, 1994.

PATON, M.W.; SUTHERLAND, S.S.; ROSE, I.R.; HART, R.A.; ELLIS, T.M. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, n. 7, p. 266-269, 1995.

PATON, M.W. Caseous lymphadenitis. **Proceedings of the Fourth International Congress for Sheep Veterinarians**, Armidale, NSW, Australia. p. 121-, Feb. 1997a.

PATON, M.W. The epidemiology of caseous lymphadenitis in Australian and observations on other production systems. En: **Proceedings of 101 Meeting of the US Animal Health Association**, October. 18-24, 1997b.

PAULE B, J.A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L.F.; CARMINETI, R.; BAHIA, C.R.; VALE, V.L.C.; MOURA-COSTA, L.F.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, L.; SCAHER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. **Vet. Immunol. Inmunopathol.** v. 96, p.129-139, 2003.

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

PEKELDER, J.J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. **Diseases of Sheep**. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 270-274, 2000.

PENE, J.; ROUSSET, F.; BRIERE, F.; CHRETIEN, I.; PALIARD, X.; BANCHER-EAU, J.; SPITS, H.; DE VRIES, J.E. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-Y. **J. Immunol.** v.141, n.1218, 1988.

PÉPIN, M.; FONTAINE, J.J.; PARDON, P., *et al.* Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Vet. Microbiol.**, v. 29, p. 123-134, 1991.

PÉPIN, M.; PATON, M.; HODGSON, A. L. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Current Topics in Veterinary Research**, v. 1, p. 63–82, 1994.

PÉPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; ROTHEL, J.S.; HODGSON, A.L.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet Res.**, v. 28, p. 149163, 1997.

PESTAKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; WALTER, M.R.; SHI, Y.; FISHER, P.B. Interleukin-10 and related citokines e receptos. **Annual Reviews Immunology**, v.22, p. 929-979, 2004.

PIONTKOWSKI, M.D.; SHIVVERS, D.W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 212, p. 1765–1768, 1998.

POHL-KOPPE, A.K.E.; BALASHOV, A.C.; STEERE., *et al.* Identification of a T cell subset capable of both IFN-gamma and IL-10 secretion in pacientes with chonic *Borrelia burgdorferi* infection. **J. Immunol.** v.160, p. 1804-1810, 1998.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY,B.; CARTER, G.R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing Company, 1994.

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

REGIS, L. **Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2001. 70 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

RIBEIRO, M.G.; JUNIOR, J.G.D.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.G.; JUNIOR, G.N.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arq. Inst. Biol.**, v. 68, p. 23-28, 2001.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7 Ed, Rio de Janeiro: Elsevier: 1592, 2005.

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

ROSA, J.S. Enfermidades em caprinos. Brasília: **Embrapa**. p.167-170, 1996.

RUIZ, J.; QUINTANA, M.; BARRERA, M. Aislamiento y clasificación Bioquímica de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la provincia de La Habana. **Rev. Salud. Vet.**, v.17, p.307-309, 1995.

RUSSELL, M. Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export? **Science**. v. 265, p. 612-4, 8036510, 1994.

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

SEILER, P.; AICHELE, P.; BANDERMANN, S.; HAUSER, A.E.; LU, B., et al. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. **Eur J Immunol.**, v.33, p.2676–2686, 2003.

SERIKAWA, S.; ITO, S.; HATTA, T.; KUSAKARI, N.; SENNA, K.; SAWARA, S.; HIRAMUNE, T.; KIKUCHI, N.; YANAGAWA, R. Seroepidemiological evidence that shearing wounds are mainly responsible for *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, p. 691–692, 1993.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G.C.; PORTELA, R.W.; BASTOS, B.L.; DORELLA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; GOUVEIA, A.M.G.; MEYER, R. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Research in **Veterinary Science**, p. 1-6, 2009.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. Subcutaneous Swellings. In: **Goat Medicine**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 46-49, 1994.

- SMITH, P.B. **Large animal internal medicine.** 4th. St Louis: Mosby; 2003.
- SOBRINHO, A.G.S. Principais Enfermidades dos Ovinos. In: **Criação de ovinos.** 2.ed. Jaboticabal: Funep, p.220-221, 2001.
- SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 156-160, 1997.
- SONGER, J.G. The Genus *Corynebacterium*. In: SONGER, J.G. **Veterinary microbiology:** bacterial and fungal agents of animal disease. St. Louis: Elsevier Saunders, p. 72-80, 2005.
- SONGER, J.G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinary Research**, n. 49, v. 2, p. 223-226, 1988.
- SONGER, J.G.; LIBBY, S.J.; IANDOLO, J.J.; CUEVAS, W.A. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, n. 58, n. 1, p. 131-136, 1990.
- SUTHERLAND, S.S.; SPEIJERS, B.A. Comparison of the exotoxins of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Res. Vet. Sci.**, v. 47, p. 190-194, 1989.
- TAKAHASHI, T.; MORI, Y.; KOBAYASHI, H., *et al.* Phylogenetic positions and assignment of swine and ovine Corynebacterial isolates based on the rDNA sequence. **Microbiol. Immunol.**, v. 41, p. 649-655, 1997.
- TASHJIAN, J.J.; CAMPBELL, S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: An electron microscopic study. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 690-693, 1983.
- TAYLOR, G.A.; FENG, C.G.; SHER, A. P47 gtpases: regulators of immunity to intracellular pathogens, **Nature Reviews / Immunology**, v.4, p. 100-109, 2004.
- TRINCHIERI, G. Regulatory role of cells producing both interferon  $\gamma$  and interleukin 10 in persistent infection. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 19, 2001.
- TRINCHIERI, G.; SCOOT, P. Interluecina 12: A proinflamatory cytokine with immunoregulatory functions. **Res. Immunol.**, v.146, p. 423-431, 1995.
- UNANIAN M, M.; SILVA A. E. D. F. & PANT K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid Northeast Brazil. **Trop. Amm. Hlth. Prod.** v.17, p.57-62, 1985.
- VALE, V.L.C. **Avaliação de aspectos da resposta imune de camundongos contra *C. pseudotuberculosis*.** Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia - UFBA. 2005.
- VALE, V.L.C.; RIBEIRO, M.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; PAULE, B.; REGIS, L.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S.; MEYER, R. **Reconhecimento de Antígeno por Caprinos**

**Naturalmente Infectados e Imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.**  
Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências da Saúde-UFBA, 2000.

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

VILLARINO, A.V., *et al.*, IL-27 Limits IL-2 Production during Th1 Differentiation. **The Journal of Immunology**, v.176, p.237-247, 2006.

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

WYNN, T. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. **Nature**, v. 4, 2004

WOLK, K.; KUNZ, S.; ASADULLAH, K.; SABAT, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? (2002).

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N.Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and feasibility of transmission by houseflies. **Vet.Quart.** Sitio Argentino de Producción Animal. V.12 (18), p.87- 89, 1996.

YERUHAM, I.; FRIEDMAN, S.; PERL, S.; ELAD, D.; BERKOVICH, Y.; KALGARD, Y. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. **Vet. Dermatol.**, v. 15, p. 315-320, 2004.

YOSWIAK, M.L.; SONGER, J.G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 3392-3397, 1993.

ZAKI, M.M. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. **Res. Vet. Sci.**, v. 9, p. 489-493, 1968.

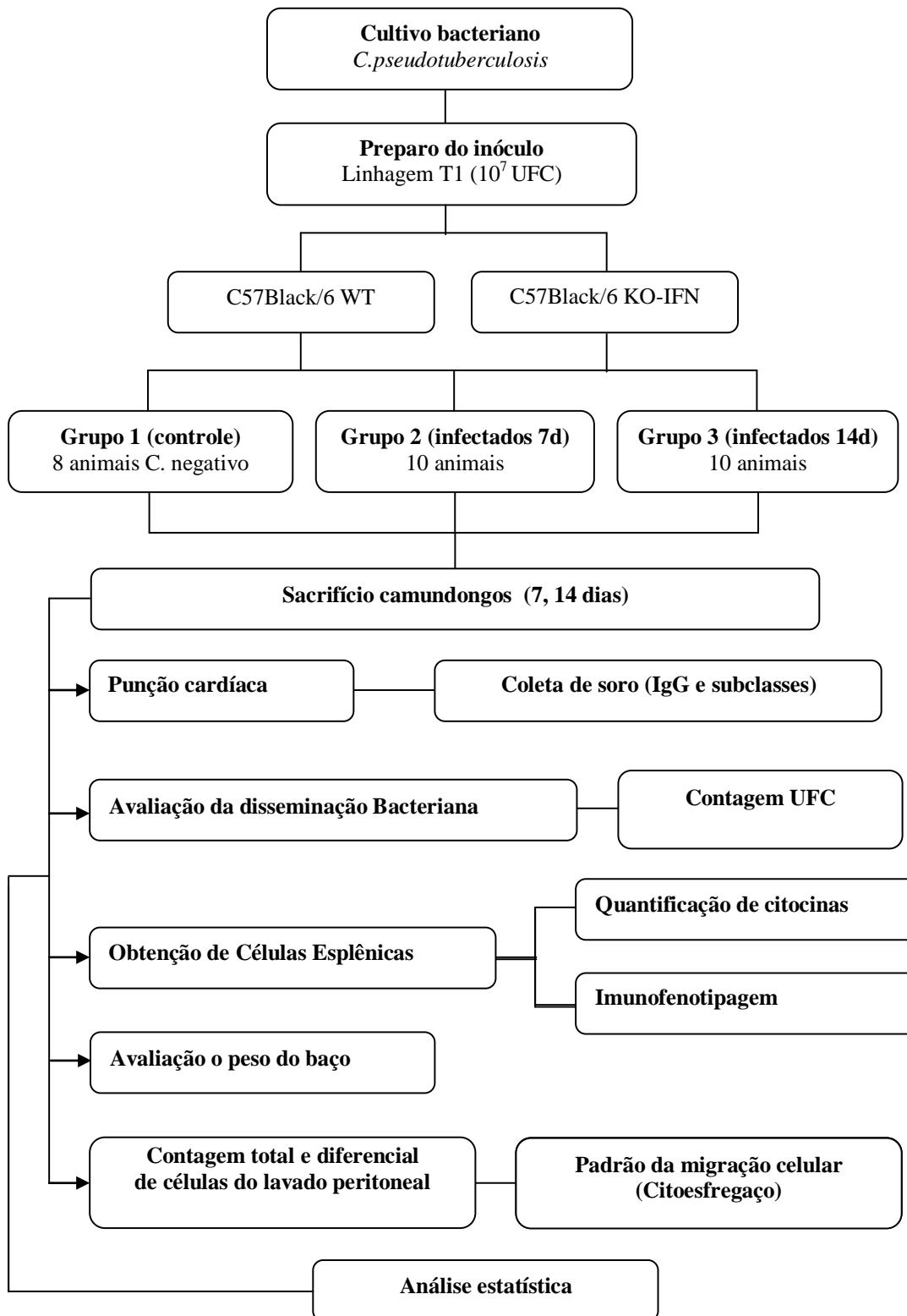
ZAKI, M.M. Relation between the toxigenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infected mice. **Res. Vet. Sci.**, v. 20, p. 197-200, 1976.

ZHAO, H.T., *et al.* Selective medium containing fosfomycin, nalidixic acid, and culture supernatant of *Rhodococcus equi* for isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **J. Vet. Méd.**, v. 38, p. 743-748, 1991.

## APÊNDICES E ANEXOS

### Apêndice A

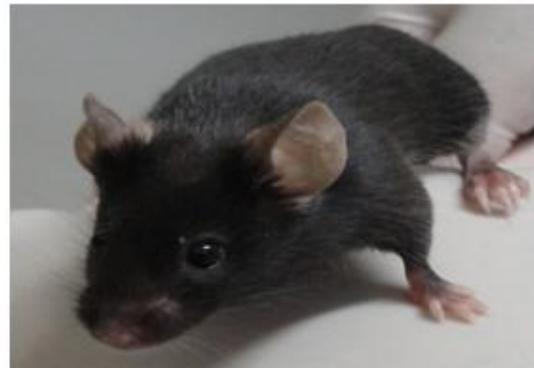
Neste apêndice está representado o delineamento experimental de todo o trabalho.



Fonte: Arquivos do autor

## Apêndice B

Neste apêndice tem-se a imagem de um Camundongo C57Black/6 (linhagem usada nos experimentos)



Fonte: Arquivos do autor

## Apêndice C

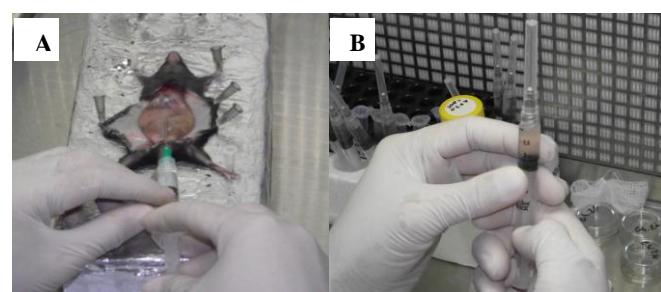
Este apêndice mostra uma imagem da retirada do sangue por punção cardíaca (A) e da incisão na região abdominal (B) nos camundongos C57 Bl/6 do grupo experimental.



Fonte: Arquivos do autor

## Apêndice D

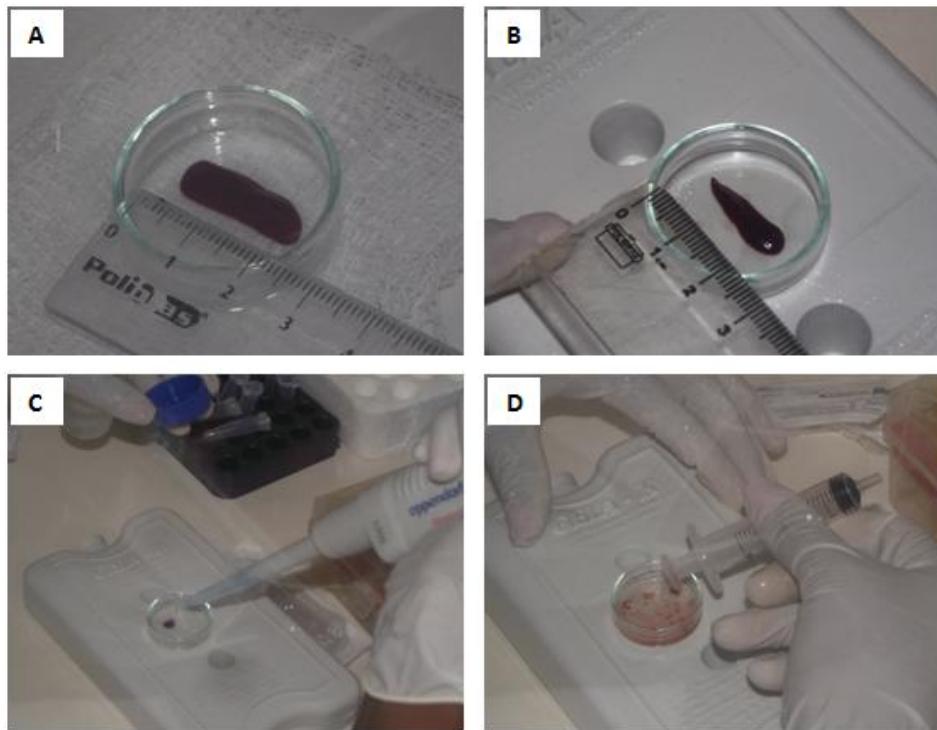
Este apêndice mostra em (A) introdução de 1,5 ml de solução fisiológica na cavidade peritoneal do camundongo, e em (B) o volume final recuperado.



Fonte: Arquivos do autor

## Apêndice E

Neste apêndice tem-se a imagem de: em **A** - baço retirado de camundongo KO-IFN; **B** - baço de C57Black/6 WT; **C** – porção do baço diluída em solução fisiológica; **D** - Maceração do baço para obtenção de esplenócitos.



Fonte: Arquivos do autor

## Apêndice F

Este apêndice apresenta animais C57Black/6 KO-IFN com granulomas e variadas regiões anatômicas.



Fonte: Arquivos do autor



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



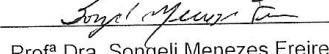
### C E R T I F I C A D O

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.

### C E R T I F I C A T E

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

CEUA-ICS  
Av. Reitor Miguel Calmon, s/n  
Vale do Canela – Salvador-BA  
CEP: 40.110-902

Telefone: (71) 3283-8958  
Telefax: (71) 3245-0917  
E-mail: [ceuaics@ufba.br](mailto:ceuaics@ufba.br)  
<http://www.moodle.ufba.br/course/view.php?id=10332>