



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



**RICARDO EVANGELISTA FRAGA**

**TRABALHO DE DOUTORADO**

**ASPECTOS DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO  
DURANTE A INFECÇÃO COM LINHAGEM SELVAGEM E  
ATENUADA DE *CORYNEBACTERIUM*  
*PSEUDOTUBERCULOSIS* EM DIFERENTES LINHAGENS DE  
CAMUNDONGOS**

Salvador  
2012

**RICARDO EVANGELISTA FRAGA**

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DA RELAÇÃO PARASITO-  
HOSPEDEIRO DURANTE A INFECÇÃO COM LINHAGEM  
SELVAGEM E ATENUADA DE *CORYNEBACTERIUM*  
*PSEUDOTUBERCULOSIS* EM DIFERENTES LINHAGENS DE  
CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Co-orientadora: Dra. Vera Lúcia Costa Vale

Salvador  
2012

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

F811 Fraga, Ricardo Evangelista.

Aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com linhagem selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos / Ricardo Evangelista Fraga. – Salvador, 2012.

181 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer Nascimento

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Lúcia Costa Vale

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. *Corynebacterium Pseudotuberculosis* 2. Camundongos.  
3. Imunologia. I. Meyer, Roberto Nascimento. II.  
Vale, Vera Lúcia Costa. III. Universidade Federal da Bahia. IV.  
Título.

CDU 616.428-002



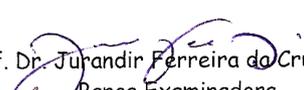
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

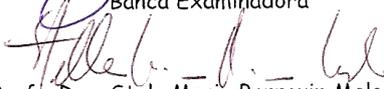


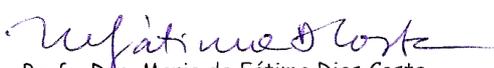
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DO DOUTORANDO  
Ricardo Evangelista Fraga.

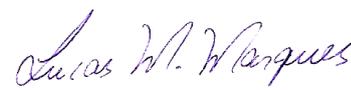
Aos três dias do mês de dezembro do ano de 2012 às 09 horas no auditório III no 2ª andar do Instituto de Ciências da Saúde, se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Vera Lúcia Costa Vale co-orientadora, Dr. Lucas Miranda Marques, Dr. Jurandir Ferreira da Cruz, Dra. Lenita Ramires dos Santos, Dra. Stela Maria Barrouin Melo com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado "Aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com Linhagem selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos" do doutorando, Ricardo Evangelista Fraga orientando do Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o Doutorando teve a sua defesa de Tese Aprovada emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, e lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Doutoranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, três de dezembro do ano de dois mil e doze.

  
Profa. Dra. Vera Lúcia Costa Vale  
Co-Orientadora

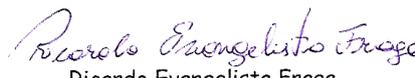
  
Prof. Dr. Jurandir Ferreira da Cruz  
Banca Examinadora

  
Profa. Dra. Stela Maria Barrouin Melo  
Banca Examinadora

  
Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa  
Coordenadora do PPGIm em exercício  
ICS/UFBA

  
Prof. Dr. Lucas Miranda Marques  
Banca Examinadora

  
Profa. Dra. Lenita Ramires dos Santos  
Banca Examinadora

  
Ricardo Evangelista Fraga  
Doutorando

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (Labimuno-ICS-UFBA) e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGI). Acredito realmente que o resultado desta tese seja um produto de um trabalho colaborativo, embora sua redação e responsabilidade sejam predominantemente individuais. Varias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão:

### **Ao Professor Dr. Roberto José Meyer Nascimento**

Pela orientação tranquila; pela confiança; pelos ensinamentos, não apenas para a minha formação como pesquisador, mas principalmente para a minha formação como pesquisador/educador e pelo exemplo a ser seguido.

### **Aos demais professores do Labimuno**

Vera Vale, Lília Moura Costa, Soraya Trindade, Songeli Freire e Ricardo Portela pelo apoio e questionamentos sobre as ideias apresentadas, que contribuíram para nortear este trabalho.

### **Aos meus Cavaleiros da Távola Redonda**

Marcos Silva, Adriano Alcântara, Italaney Fehlberg, Geraldo Pedral, Andréia Pacheco, Rejane Rodrigues, Igor Tavares, Rosa Guedes, Valdirene, Priscila, Patrícia Meira e principalmente Heydeane Alves e Milton Galdino que reafirmaram que o melhor trabalho é o feito em equipe.

### **Aos alunos parceiros**

De Salvador: Bárbara Cássia, Diego Souza, Vitor Magalhães, Carlos Jukove, Bruno Noronha, Ricardo Souto, De Vitória da Conquista: Inaiara Sousa, Layane Badaró, Luana Alves, Antônio Santiago e Jéssica Mendes pela energia contagiante, companheirismo e dedicação.

### **Aos colegas do Instituto Multidisciplinar em Saúde – IMS-UFBA**

Pelo apoio e principalmente pela compreensão da árdua tarefa de realizar um doutorado em outra cidade. Um agradecimento especial aos coordenadores dos cursos ao qual sou vinculado: Raquel Gestinari, Tiana Baqueiro e ao amigo Márcio Borba pelo apoio fundamental.

### **Aos amigos do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz – CPqGM - Fiocuz**

Dr. Geraldo, Dr. Washington, Dra. Cristiane Garbodine e ao Biotério, representado por Vitor, pela contribuição durante esta trajetória e por me mostrar que os verdadeiros amigos estão sempre disponíveis.

### **A família do Labimuno**

Dona Chica, Rafaela, Zilda, Lú, Manuel, José e Mário pelo apoio sempre presente e carinho.

### **Aos amigos inesquecíveis**

Hermes, Aline, Jaciara, Bel, Mauren, Zinke, Leila, Liege, Poli Martins, Pat Beline e Pires, Lai Tomazi, Edi, Finos Trapos e Ana Paula que me mostraram que ter amigos é ter alicerces seguros.

### **À minha fundamental família**

Maria Regina, Jorge, Áurea, Fabio, Manuela, Davi, Rafael e Roberto. Meus eternos agradecimentos. Peças cruciais para a minha formação como ser humano.

“Compreendi que viver é ser livre... Que ter amigos é necessário... Que lutar é manter-se vivo... Que pra ser feliz basta querer... Aprendi que o tempo cura... Que magoa passa... Que decepção não mata... Que hoje é reflexo de ontem... Compreendi que podemos chorar sem derramar lágrimas... Que os verdadeiros amigos permanecem... Que dor fortalece... Que vencer engrandece... Aprendi que sonhar não é fantasiar... Que pra sorrir tem que fazer alguém sorrir... Que a beleza não está no que vemos, e sim no que sentimos... Que o valor está na força da conquista... Compreendi que as palavras tem força... Que fazer é melhor que falar... Que o olhar não mente... Que viver é aprender com os erros... Aprendi que tudo depende da vontade... Que o melhor é ser nós mesmos... Que o segredo da vida é viver !!!”

Clarice Lispector

FRAGA, Ricardo Evangelista. Avaliação de aspectos da relação parasito-hospedeiro durante a infecção com Linhagem selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos. 207f. Il. 2012. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

## RESUMO

O presente trabalho trata de estudos relacionados à *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Cp*), agente etiológico da linfadenite caseosa. Tem como finalidade estabelecer o perfil da resposta imune durante o percurso da infecção por estirpe atenuada (T1), relacionado ao primeiro experimento, ou selvagem (C57), segundo experimento, de *Cp*, em diferentes linhagens de camundongos, e desta forma estabelecer o padrão de resposta imune em animais susceptíveis e resistentes, além de avaliar o envolvimento do óxido nítrico, INF-gama e da citocina IL-10 no início do processo infeccioso. Uma comparação entre as respostas imunes a estas duas estirpes foi feita no terceiro experimento. Na metodologia empregada, para o primeiro e segundo experimento, foram utilizados 133 animais de diferentes linhagens, por experimento, sendo: de linhagem heterogênea - 28 *Swiss*; de linhagem isogênica - 28 *Balb/c*, 35 *C57Black/6* selvagem, 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para óxido nítrico (ON), 14 *C57Black/6-KO-IFN-gama* e 14 *C57Black/6 knockout-KO-IL-10*. Cada linhagem estudada foi dividida em dois grupos (controle e teste). Para o terceiro experimento foram utilizados 15 animais *Balb/c* divididos em três grupos. Os animais do grupo teste foram infectados com a estirpe T1 com  $10^7$ /ml (1° experimento), a C57 com  $10^2$ /ml (2° experimento) ou  $10^4$ /ml das duas estirpes (T1 ou C57), no 3° experimento. Após a infecção os animais *Swiss*, *Balb/c* e *C57Black/6* selvagens, foram avaliados aos 07, 30, 60 e 120 dias, enquanto que os animais *C57Black/6* selvagens e *knockout*, foram analisados aos 07 e 14 dias (1° e 2° experimentos). Os animais referentes ao 3° experimento foram avaliados aos 70 dias após a infecção. Foi realizada a construção da curva de mortalidade; avaliação morfológica, que constava da identificação de granulomas, bem como dos locais de acometimento e avaliação do peso do baço; avaliação do direcionamento celular para o local da infecção, que corresponde a avaliação total e diferencial das células da cavidade peritoneal; produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2, IL-17 por células aderentes da cavidade peritoneal estimuladas com antígenos secretados ou com bactéria viva (1° e 2° experimento); imunofenotipagem, avaliando as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>; bem como a mensuração das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no homogenato do baço, em todos os experimentos. Os resultados obtidos mostram uma diferença entre as linhagens *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss* no tipo de resposta imune estabelecida durante infecção com T1 e com C57, onde os animais *C57Black/6* demonstraram ser mais resistentes. Dentre os animais nocauteados, aqueles KO-IL-10 demonstraram ser mais resistentes, enquanto que os animais KO-ON e KO-INF- $\gamma$  foram mais sensíveis à infecção. No 3° experimento foi possível visualizar que a estirpe C57 induziu alterações morfológicas mais acentuadas e maior direcionamento de células para o local da infecção, quando comparada com tais induções feitas pela estirpe T1. Com os experimentos realizados e resultados obtidos, pretendeu-se fornecer subsídios para uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro no modelo murino, em infecções experimentais que confrontam duas estirpes desta bactéria com diferentes linhagens de camundongos. Estes conhecimentos poderão orientar a construção de protocolos de imunização/desafio visando o desenvolvimento de vacinas ou/e imunoterapias.

**Palavras chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Camundongos. Resposta Imune.

FRAGA, Ricardo Evangelista. Evaluation of aspects of host-parasite relationship during infection with wild strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and attenuated in different strains of mice. 207f. Il. 2012. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

### ABSTRACT

The present work deals with studies related to *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C.p.*), the etiologic agent of caseous lymphadenitis. Its finality is to establish the immune response profile during the course of infection by a attenuated *C.p* strain (T1), concerning the first experiment, and by a wild *C.p.* strain (C57), concerning the second experiment, in different mice lineages, thereby evaluating the immune response pattern in susceptible and resistant animals, in addition to evaluating the involvement of nitric oxide (NO), IFN-gama, and IL-10 in the beginning of the infectious process. Furthermore, this study aims to compare the immune response established by these two strains, concerning the third experiment. The applied methodology consisted of 133 animals of different lineages, for each experiment (1° and 2°), these being: The heterogeneous lineage – 28 *Swiss* animals; the isogenic lineage – 28 *Balb/c* animals, 35 wild *C57Black/6* animals, 14 *C57Black/6* nitric oxide *knockout* (KO) animals, 14 *C57Black/6* IFN-gama KO animals, and 14 *C57Black/6* IL-10 KO animals, each lineage being divided in two groups: control and test. For the third experiment, 15 *Balb/c* animals were used, divided in three groups. This experiment's mice were infected with the T1 strain ( $10^7$ /ml), also used in the first experiment; with the C57 strain ( $10^2$ /ml), also used in the second experiment; or  $10^4$ /ml of both strains (T1 or C57). After the infection the *Swiss*, *Balb/c* and wild *C57/Black6* mice were evaluated with 07, 30, 60 and 120 days. While the wild and KO *C57Black/6* animals were analyzed with 07 and 14 days (first and second experiment). The third experiment's animals were evaluated with 70 days after infection. During the experiment were performed: the construction of a mortality curve; a morphologic evaluation, consisting of identification of granulomas, as well as the sites affected and evaluation of the spleen weight; the analysis of the cellular migration to the site of infection, that corresponds to the total number of cells in the peritoneal cavity and the differentiation of these cells; the evaluation of cytokine production (IL-1 $\alpha$ , TNF-  $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2, IL-17) by adherent cells in the peritoneal cavity stimulated with secreted antigens or the live bacteria (the first and second experiment); immunophenotyping, evaluating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as well as measuring the production of the cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the spleen homogenate, in all the experiments. The obtained results show difference between the *Balb/c*, *C57Black/6* and *Swiss* lineages concerning the immune response pattern established during the infection by the T1 and C57 strains, where the *C57Black/6* animals showed resistance. Besides, the IL-10-KO animals presented more resistance, while the NO-KO and INF-gama-KO animals were more susceptible to infection. In the third experiment, it was observed that the C57 strain showed more pronounced morphologic alterations, compared to the T1 strain. Thus, the present work contributes to the understanding of the host-parasite interaction, during the infection by attenuated and wild strains of *C.p.* in different mice lineages, describing aspects related to the immune response in susceptible and resistant animals, and may contribute to immunization/challenge protocol evaluation aiming the development of vaccines and/or immunotherapies.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Mice; Immune Response.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	11
2.1. LINFADENITE CASEOSA .....	11
2.1.1 Agente Etiológico.....	11
2.1.2 Patogênese.....	13
2.1.3 Prevalência.....	14
2.1.4 Resposta Imune .....	15
2.1.5 Tratamento e Profilaxia.....	19
2.1.5.1 Vacinas como ferramenta no controle da LC .....	20
2.1.5.1.1 Vacinas de primeira geração.....	20
2.1.5.1.2 Vacinas de segunda geração.....	21
2.1.5.1.3 Vacinas de terceira geração.....	22
2.1.6 Modelo Murino.....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	24
3.1 OBJETIVO GERAL .....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	25
4.1. MANUSCRITO 01: Estudo de Aspectos da Resposta Imune em Diferentes Linhagens de camundongos Após Infecção com Estirpe Atenuada de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	26
4.1.1 Introdução.....	28
4.1.2 Materiais e Métodos.....	29
4.1.3 Resultados .....	38

4.1.4 <b>Discussão</b> .....	42
4.1. MANUSCRITO 02: Avaliação da Resposta Imune Em Diferentes Linhagens de Camundongos Após Infecção com uma Linhagem Selvagem de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	69
4.1.1 <b>Introdução</b> .....	71
4.1.2 <b>Materiais e Métodos</b> .....	73
4.1.3 <b>Resultados</b> .....	81
4.1.4 <b>Discussão</b> .....	87
4.1. MANUSCRITO 03: Caracterização da Resposta Imune Após Infecção com Duas Diferentes Linhagens de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em Camundongos Balb/c	111
4.1.1 <b>Introdução</b> .....	113
4.1.2 <b>Materiais e Métodos</b> .....	115
4.1.3 <b>Resultados</b> .....	121
4.1.4 <b>Discussão</b> .....	123
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	133
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	135
<b>APÊNDICES</b> .....	156
APÊNDICE A: Médias aritméticas e desvio padrão do manuscrito 01 .....	157
APÊNDICE B: Médias aritméticas e desvio padrão do manuscrito 02 .....	166
APÊNDICE C: Médias aritméticas e desvio padrão do manuscrito 03 .....	176
<b>ANEXOS</b> .....	178
ANEXOS A: Resumo do Artigo Submetido .....	179
ANEXOS B: Autorização CEUA.....	181

## INTRODUÇÃO

---

Várias bactérias são responsáveis por causar diversas patologias em pequenos ruminantes. A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa crônica presente em animais de vários países do mundo incluindo o Brasil, que acomete principalmente os caprinos e os ovinos. Esta doença é ocasionada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um coccobacilo Gram positivo, intracelular facultativo de macrófagos, imóvel, não esporulado, anaeróbico facultativo, que foi isolado pela primeira vez em 1888 por Edward Nocard de uma linfangite bovina e, posteriormente, em 1891 por Hugo von Preisz de um abscesso renal ovino. (BATEY, 1986b; DORELLA et al., 2006c; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Nos pequenos ruminantes a doença se caracteriza por um quadro de formação de granulomas nos linfonodos externos e internos e em vísceras como os pulmões, rins e fígado (SMITH & SHERMAN, 1994; PEKELDER, 2000; KURIA et al., 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007; SOARES, VIANA & LEMOS, 2007). Os granulomas são constituídos de camadas concêntricas de macrófagos, e principalmente linfócitos, tanto os T CD4<sup>+</sup> quanto os linfócitos TCD8<sup>+</sup>, estas células estão distribuídas em torno de um centro necrótico e circundadas por uma cápsula fibrosa (PÉPIN et al., 1994b; RADOSTITS et al., 2002; FONTAINE & BAIRD, 2008).

Geralmente a doença está associada a uma debilidade geral do animal, afetando o seu ganho de peso e a sua eficiência reprodutiva; desvalorização da pele; elevação dos custos com medicamentos para o tratamento das lesões externas; diminuição da produção de leite e carnes; condenação de carcaças e vísceras e, nos casos mais graves, resultar na morte dos animais (MEYER et al., 2002).

A imunidade estabelecida a esta bactéria intracelular facultativa é complexa e envolve tanto mecanismos da resposta imune inata, quanto adaptativa. Na resposta imune inata, os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas no início da infecção. A presença destes tipos celulares pode ser crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e também secundária a LC (JOLLY, 1965a; HARD, 1969; LAN et al. 1999), uma vez que são as responsáveis pela fagocitose e destruição dos microrganismos (NORTH, 1978). Entretanto, bactérias intracelulares patogênicas, sendo resistentes à degradação dentro dos fagócitos, principalmente por alterar a produção de óxido nítrico destas células, tendem a causar infecções crônicas, difíceis de serem erradicadas (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983). Desta forma, torna-se importante o auxílio da resposta imune adaptativa que favoreça a ação da fagocitose para eliminar/conter o microrganismo, como por exemplo, a

*C. pseudotuberculosis*. Desse modo, um envolvimento das células T CD4<sup>+</sup>, subpopulação Th1, torna-se uma importante ferramenta (JOLLY, 1965b; LAN et al., 1998).

O controle deste agravo deve estar apoiado em medidas que possam inibir a entrada/disseminação de *C. pseudotuberculosis* no rebanho, sendo assim, a imunoprofilaxia, baseada no estabelecimento de vacinas, é uma importante ferramenta frente à LC (PIONTKOWSKI & SHIVVERS, 1998; PATON et al., 2003; DORELLA et al., 2006a). Ademais, diversos grupos vêm trabalhando, utilizando-se de diferentes protocolos, na tentativa de conceber uma vacina eficaz frente a este microrganismo.

Diante destas observações, e por entender que a caprinocultura e a ovinocultura são atividades rurais de grande importância para o Brasil, principalmente para os pequenos e médios produtores da região Nordeste, que estudos voltados para agravos como a linfadenite caseosa são importantes. Estas atividades constituem as principais fontes econômicas e nutricionais dessa população, além de exercerem uma função social de elevada importância, devido à fixação do homem no campo, contribuindo, assim, para a diminuição do êxodo rural. Além disso, a ampliação do conhecimento sobre os diversos aspectos da relação *parasito-hospedeiro* são fundamentais para o estabelecimento de estratégias eficientes na contenção e eliminação deste agravo, uma vez que, para se desenvolver uma vacina que seja eficaz frente a um patógeno é necessário considerar a epidemiologia e a imunologia da infecção natural, ou a fisiologia do patógeno em questão. Assim, o empenho para se conhecerem como cepas virulentas e atenuadas de *C. pseudotuberculosis* se relacionam com o hospedeiro gera informações úteis para o desenvolvimento de novas vacinas, kits de diagnóstico e terapia efetiva, além de gerar conhecimento sobre a cinética das respostas imunes contra bactérias intracelulares.

Ademais, foi proposta do presente trabalho, avaliar aspectos da relação *parasito-hospedeiro* durante a infecção com cepa selvagem e atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos, com o intuito de verificar se a existência de diferenças, tanto relacionadas com particularidades imunológicas do hospedeiro, quanto inerentes ao microrganismo, interferem na relação *parasito-hospedeiro*. Com este intuito foram realizados três experimentos onde o primeiro se refere à avaliação de uma cepa atenuada, o segundo utilizando uma cepa recentemente obtida de um caprino naturalmente infectado, enquanto que o terceiro compara estas duas cepas administradas na mesma concentração.

## REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 Linfadenite Caseosa

A linfadenite caseosa, doravante (LC), também conhecida como mal do caroço ou falsa tuberculose, é uma doença infectocontagiosa crônica, que acomete principalmente os pequenos ruminantes, caprinos e ovinos, entretanto, pode, em menor grau, causar linfagite ulcerativa em equinos e dermatite ulcerativa em bovinos, búfalos e cervos (BENHAM et al., 1962; LOPEZ et al., 1966; ZAKI, 1976; BATTEY & TONGE, 1968; CAMERON & MINNAR, 1969; AYERS, 1977; BATEY, 1986a). A LC não é considerada uma zoonose, entretanto já foram registrados casos humanos relacionados com este microrganismo, geralmente referido a uma exposição ocupacional, demonstrando o seu potencial para tornar-se uma (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997; LIU et al., 2005).

#### 2.1.1 Agente Etiológico

A linfadenite caseosa é causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* pertencente ao gênero *Corynebacterium* e ao mesmo grupo supragenérico dos gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardia*, que corresponde ao *Actinomycetes* (WILLIAMSON, 2001; PAULE et al., 2004; DORELLA et al., 2006c; BAIRD & FONTAINE, 2007; D'AFONSECA et al., 2008). É caracterizada como um cocobacilo Gram positivo, intracelular facultativo de macrófagos, embora possa infectar outras células como as células renais de caprinos, é pleiomórfico, imóvel, não esporulado, anaeróbico facultativo, possuindo dimensões que variam entre 0,5 - 0,6 µm de diâmetro e 1-3 µm de comprimento. A bactéria pode se apresentar isolada ou formando grupamentos irregulares, pequenos, brancos e secos (BATEY, 1986b; DORELLA et al., 2006c; BAIRD & FONTAINE, 2007; VALDIVIA, et al., 2012). É um microrganismo mesofílico, cuja temperatura ideal de crescimento é 37°C, o pH ideal está entre 7,0 e 7,2, e que requer um período de incubação de 48 a 72 horas (MERCHANT & PACKER, 1975; MOURA-COSTA, 2002; DORELLA et al., 2006a).

Ao que se refere às características bioquímicas, é possível observar que este microrganismo apresenta uma grande capacidade fermentativa, sendo capaz de utilizar para tal propriedade, uma variada fonte de carboidratos como a glicose, frutose, manose, maltose e sacarose, com produção de ácido, entretanto sem a produção de gás. Mostra-se positiva para

os testes de catalase, urease e fosfolipase D, porém negativa para os testes de oxidase, esculina, hidrólise de gelatina, digestão da caseína e fermentação da lactose. A redução de nitrato é variável, não sendo geralmente observada em estirpes isoladas de pequenos ruminantes (biovar *ovis*) e sim a partir do isolamento de equinos e bovinos (biovar *equi*) (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA et al., 2006a). Em relação às variações bioquímicas observadas, principalmente em relação à fermentação de carboidratos, Songer e seus colaboradores (1988), atribuíram a possibilidade da existência de vários biovars entre as espécies e/ou ao uso de diferentes métodos por diferentes pesquisadores na caracterização bioquímica destas bactérias. O isolamento de *C. pseudotuberculosis* originados de animais domésticos são fenotipicamente heterogêneos e são estas peculiaridades que podem contribuir de formas diferentes para a virulência deste microrganismo (NIETO et. al., 2009; SOUZA, 2009).

Embora seja uma bactéria beta-hemolítica, a hemólise ao redor das colônias é variável, podendo não ser observada no período de 48 a 72hs. Quando se acrescenta ao meio o detergente *Tween* 80, a atividade hemolítica das cepas é favorecida, assim como grandes zonas se desenvolvem na presença de *Rhodococcus equi* (DORELLA et al., 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Uma vez que é relativamente recente o sequenciamento de genes deste microrganismo (RUIZ et al., 2011), até o momento, somente alguns fatores de virulência que conferem características patogênicas à *C. pseudotuberculosis* foram bem descritos e caracterizados, sendo eles a fosfolipase D, doravante (PLD), e os ácidos corinomicólicos (BAIRD & FONTAINE, 2007).

A PLD é uma exotoxina hemolítica catiônica de aproximadamente 31 kDa (JOLLY, 1995a). Caracterizada como uma fosfatidilcolina fosfatidohidrolase, descrita inicialmente por Carne (1940), atuando tanto na disseminação quanto na sobrevivência da bactéria no hospedeiro, principalmente por hidrolisar a esfingomielina, um componente importante da membrana celular do hospedeiro, aumentando a permeabilidade capilar, e desta forma a disseminação pelo hospedeiro (CARNE & ONON, 1978; MUCKLE & GYLES, 1983). Essa exotoxina além de auxiliar na disseminação provoca também uma reação inflamatória intensa (TAMBOURG, 2006). A inativação desta enzima em microrganismos mutantes interfere diretamente na persistência e disseminação desta bactéria, uma vez que estes mutantes não são capazes de estabelecer uma infecção primária ou a formação de granulomas nos linfonodos regionais (McNAMARA et al., 1994). Esta exotoxina parece não ser um fator

piogênico (formação de granulomas), e sim de disseminação do agente infeccioso no hospedeiro (ZAKI, 1976).

Os ácidos corinomicólicos, por criarem uma espessa camada cerosa que reveste a parede celular da bactéria, estão envolvidos na proteção contra a digestão pelas enzimas intracelulares do hospedeiro, capacitando sua sobrevivência e proliferação no interior dos macrófagos. Estes ácidos graxos apresentam propriedades citotóxicas e induzem a caseificação (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983; BRAITHWAITE et al., 1993; WILLIAMSON, 2001; BILLINGTON et al., 2002; PAULE et al., 2004; BAIRD & FONTAINE, 2007). Uma relação entre virulência e a 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 & GYLE, 1983).

### 2.1.2 Patogênese

Nas infecções naturais dos pequenos ruminantes, a bactéria utiliza como a principal porta de entrada, ferimentos ou pequenas abrações na superfície da pele (DORELLA et al., 2006a; BAIRD & FONTAINE, 2007). Após a entrada, ocorre a formação de pequenas lesões granulomatosas geralmente no local de acesso, comumente a região subcutânea, ou nos linfonodos superficiais, originando a LC externa ou superficial (SMITH & SHERMAN, 1994; KURIA et al., 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007; SOARES, VIANA & LEMOS, 2007). À medida que o microrganismo se dissemina, utilizando a via linfática ou sanguínea, as lesões se desenvolvem em órgãos internos, comumente nos linfonodos mediastínicos ou nos pulmões, entretanto qualquer órgão pode ser acometido. Esta forma é conhecida como LC visceral, sendo observada com mais frequência em ovinos que nos caprinos (PEKELDER, 2000; KURIA et al., 2001; BAIRD & FONTAINE, 2007).

Os granulomas da LC são resultados principalmente da resposta imune do hospedeiro como um mecanismo para conter a disseminação deste microrganismo (PEKELDER, 2000). As lesões são constituídas de camadas concêntricas de macrófagos, e principalmente linfócitos, T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, estas células estão distribuídas em torno de um centro necrótico e circundadas por uma cápsula fibrosa. O centro necrótico contém pus de coloração variando do branco ao amarelado e/ou esverdeado que, inicialmente, é mole e semifluido, evoluindo com o tempo, para uma consistência pastosa, chegando à caseosa nas lesões mais antigas

(PÉPIN et al., 1994b; WILLIAMSON, 2001; RADOSTITS et al., 2002; FONTAINE & BAIRD, 2008). É identificada uma semelhança entre os granulomas causados pela infecção por *C. pseudotuberculosis* e os causados por *Mycobacterium tuberculosis*. Tal semelhança é esperada, uma vez que há aproximação filogenética entre estes dois microrganismos (PASCUAL et al., 1995).

Além da visualização de granulomas é possível identificar em exames laboratoriais nos caprinos e ovinos a presença de anemia, leucocitose com neutrofilia e altos níveis de fibrinogênio, hipoproteinemia ou uma hiperproteinemia por aumento de imunoglobulinas (principalmente IgG) e aumento de Interferon gama (PAULE et al., 2003).

As lesões granulomatosas, quando se rompem, liberam o material caseoso, que é rico em bactérias viáveis, que representa uma fonte de contaminação horizontal entre os animais (BROWN & OLANDER, 1987 *apud* FONTAINE & BAIRD, 2008). Este material caseoso pode contaminar a pele ou o meio ambiente em que este animal vive, e assim ocorrer a transmissão por contato físico direto dos animais sadios com o animal infectado ou, indiretamente, via fômites contaminados (DORELLA et al., 2006a).

### **2.1.3 Prevalência**

A linfadenite caseosa é uma patologia presente em animais de vários países, principalmente naqueles que possuem uma significativa população de pequenos ruminantes. A doença já foi descrita em países como: Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, França, Itália, Dinamarca, Argentina, Chile, Uruguai, Venezuela, Turquia, Cuba e Brasil (RUIZ et al., 1995; LITERAK et al., 1999, MOLLER et al., 2000; WILLIAMSON, 2001; ARSENAULT et al., 2003; CABRERA et al., 2003; CHIRINO-ZARRAGA et al., 2005; DORELLA et al., 2006a). A infecção pelo *C. pseudotuberculosis* acomete os animais de ambos os sexos e idades, contudo, apresenta-se mais prevalente entre o primeiro e o segundo ano de vida do animal e em fêmeas (AL-GAABARY et al., 2009).

Estima-se que no Brasil, que ocupa o 15º lugar em relação ao tamanho do rebanho de pequenos animais, correspondendo a 26.000.000 de cabeças (FAO, 2008), a prevalência clínica da LC possa atingir 30% a 50% dos animais (FARIA et al., 2004). A região Nordeste possui a maior concentração de rebanhos do país, apresentando cerca de 91% da população de caprinos e 56% da população ovinos, e seria a região mais acometida (RIBEIRO et al., 1991; ALVES & PINHEIRO, 1997; IBGE, 2012).

A Bahia por deter o maior efetivo de caprinos e o segundo maior de ovinos do país com 33,7% e 19,1% do efetivo nacional, respectivamente (BRASIL, 2007), é o estado nordestino mais afetado. Principalmente nas regiões semiáridas onde os animais são criados de forma extensiva na vegetação espinhosa da Caatinga, favorecendo, assim, a contaminação dos animais e a disseminação da doença. Um estudo sorológico realizado no ano de 2003 em 19 municípios do semiárido baiano demonstrou uma prevalência média de 46,6% da LC em caprinos (MEYER, 2003).

A LC é responsável por grandes perdas econômicas, principalmente na Bahia, onde o pequeno produtor tem na caprinocultura a sua fonte de renda familiar preponderante (RIBEIRO et al., 1988; MOURA-COSTA, 2002; MEYER, 2003; DORELLA et al., 2006a). Esta patologia é a responsável por comprometimento do couro, principalmente devido à formação de cicatrizes nos locais dos granulomas superficiais, que desvalorizam a pele. Além disso, pode ocasionar perda de peso, desordens reprodutivas (como abortos e mortalidade neonatal), diminuição da produção de carne, lã e leite, condenação da carne e vísceras e nos casos mais graves, resultar na morte dos animais (NAIRN & ROBERTSON, 1974; AYERS, 1977; ASHFAQ & CAMPBELL, 1979; BURREL, 1981; EGGLETON et al., 1991; ALONSO et al., 1992; MEYER et al., 2002).

#### **2.1.4 Resposta Imune**

A imunidade estabelecida frente a este microrganismo, bactéria intracelular facultativa, é complexa e envolve tanto mecanismos da resposta imune inata quanto adaptativa. Na resposta imune inata, os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas no início da infecção e a presença destes tipos celulares pode ser crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e secundária (JOLLY, 1965a; HARD, 1969; LAN et al., 1999), uma vez que, estas células são as principais responsáveis em realizar a fagocitose e destruição dos microrganismos (NORTH, 1978). Entretanto, bactérias intracelulares patogênicas sendo resistentes à degradação dentro dos fagócitos, tendem a causar infecções crônicas, difíceis de serem erradicadas (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983; REINOUT et al., 2002).

Os neutrófilos são células essenciais para a defesa contra a infecção primária, atuando para restringir o crescimento bacteriano ou agindo sobre as células infectadas de forma independente das atuações dos macrófagos e das células *Natural Killer* - NK (CONLAN & NORTH, 1991; ROGERS & UNANUE, 1993; SJÖSTEDT et al., 1994). Camundongos cuja

atuação destas células foram bloqueadas, sucumbem às infecções por *Francisella tularensis* ou *Listeria monocytogenes*, microrganismos intracelulares facultativos. Tal resultado demonstra que os neutrófilos são essenciais para restringir o crescimento destas bactérias, antes que elas sejam capazes de atingir números suficientes para oprimir o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (CONLAN & NORTH, 1991; SJÖSTEDT et al., 1994).

Os macrófagos, por sua vez, atuam na eliminação dos microrganismos fagocitados principalmente pela atuação do óxido nítrico (NO), gás solúvel altamente lipofílico, produzido pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS). Esta produção pode ocorrer, prioritariamente, pela ação de citocinas pró-inflamatórias, como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (PÉPIN et al., 1992; MACHADO, 2004; MAYER, 2006). O NO possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos através da sua ligação direta com metais, principalmente o ferro, presente nas enzimas do seu alvo (JAMES, 1995; NATHAN & SHILOH, 2000; DUSSE, VIEIRA & CARVALHO 2003). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de *Krebs*, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular, tão importantes para a sobrevivência e proliferação de microrganismos. Nas infecções, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) resulta na formação de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um poderoso oxidante de proteínas. (BECKMAN & KOPPENOL, 1996). Apesar desta poderosa ferramenta, os macrófagos podem não conseguir destruir a *C. pseudotuberculosis*, este fato pode estar relacionado a não produção do NO quando essas células estão sob estímulo dos antígenos desse patógeno (GREEN et al., 1991; BOGDAN et al., 1997).

A atração de macrófagos e neutrófilos para o local da infecção, bem como a sua ativação podem ser influenciadas principalmente por um grupo de citocinas denominadas pró-inflamatórias. Dentre elas, destaca-se a citocina IL-6, que estimula a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e estimula a produção de neutrófilos (APPELBERG et al., 1994; LEAL et al., 1999; DIAS et al., 2011). As citocinas TNF- $\alpha$  e a citocina IL-1 $\alpha$  atuam aumentando a permeabilidade vascular permitindo a passagem de células recrutadas da resposta imune inata, além de promover a ativação destas células. O TNF- $\alpha$  também pode atuar como indutor de coagulação, sendo um importante agente na formação de granuloma. O INF- $\gamma$  também atua ativando principalmente os macrófagos induzindo a produção de NO e a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos - MHC de classe I e II, que atuam no

processo de ativação das células da resposta imune adaptativa (NOLL et al., 1996; PERRY et al., 1997; ALLIE et al., 2009; BRANDÃO et al., 2011; DIAS et al., 2011).

O INF- $\gamma$  é secretado por células NK e macrófagos, como também por células da resposta imune adaptativa, tanto os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, quanto os T CD8<sup>+</sup>. Esta citocina possui receptores em quase todas as células onde é capaz de ativar diversas respostas antimicrobianas. 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), como as 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, permitindo uma interação entre a resposta imune inata e adaptativa (BOEHM et al., 1997; MEYER et al., 2005).

Por se tratar de um microrganismo capaz de sobreviver dentro das células fagocíticas, principalmente pela inibição da produção do NO (GREEN et al., 1991; BOGDAN et al., 1997), uma resposta imune adaptativa que potencialize a ação da fagocitose torna-se um mecanismo importante para eliminar/conter a *C. pseudotuberculosis* (JOLLY, 1965b; LAN et al., 1998).

Desta forma, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são importantes para definir o tipo de resposta montada frente a um microrganismo, principalmente devido à possibilidade de apresentar perfis distintos. A população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> pode ser dividida em subpopulações de células, as mais bem estudadas e caracterizadas são as células T auxiliaadoras tipo 1 (Th1) e células T auxiliaadoras do tipo 2 (Th2). Quando estimuladas, as células Th1 produzem, dentre outras citocinas, o IFN- $\gamma$ , a IL-2 e o TNF- $\alpha$ , as quais promovem mecanismos efetores celulares, incluindo hipersensibilidade tardia, reações inflamatórias e, no camundongo, a produção de anticorpos da classe IgG2a, os quais são capazes de favorecer, direta ou indiretamente, a opsonização e toxicidade mediada por células. Tais mecanismos efetores são direcionados ao combate a patógenos intracelulares. Por outro lado, após estimulação, as células Th2 produzem IL-4 e IL-5, promovem síntese de anticorpos IgE e, em camundongos, IgG1, responsáveis pela imunidade humoral e reações alérgicas (MOSMANN et al., 1986; COFFMAN, 2006). Estas subpopulações de linfócitos T exercem um controle recíproco, uma vez que a resposta Th1 pode inibir o desenvolvimento de uma resposta Th2 (HOFSTRA et al., 1998; COTTREZ et al., 2000) e vice-versa (POWRIE et al., 1993).

Estudos vêm mostrando que o envolvimento da resposta celular, mais especificamente, da indução de uma resposta Th1, é a mais satisfatória na resistência contra bactérias

intracelulares facultativas uma vez que auxilia o mecanismo de fagocitose e destruição destes patógenos (KAUFMANN, 1993). Entretanto, o desenvolvimento de um perfil Th2 também é necessário, principalmente por atuar na formação de granulomas e, no caso desta enfermidade, na formação de anticorpos que neutralizam a exotoxina de *C. pseudotuberculosis*.

O desenvolvimento de uma resposta Th1 potente, principalmente com a produção de IFN- $\gamma$ , 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- $\gamma$  estimula várias quimiocinas, possivelmente capazes de reduzir a vascularização, levando à hipóxia do granuloma e gerando a necrose caseosa (EHLERS, 2001).

Neste processo, a interleucina-10 (IL-10) é um importante elemento na regulação da resposta imune, 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 antígenos, inibindo a transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-12. Atuando também na inibição da expressão do MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias, bem como a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, diminuindo a resposta imune sistêmica (FIORENTINO, BOND & MOSMANN, 1989; OSWALD et al., 1992; MOORE et al., 2001).

Esta citocina previne apoptose mediada pelo TNF- $\alpha$  em macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* possibilitando a manutenção da infecção crônica (ROJAS et al., 1999). Por outro lado, a IL-10 modula a atividade das citocinas do perfil Th1 como o IFN- $\gamma$ , atuando também na regulação da formação de fibrose, importante para a formação do granuloma, mediada por citocinas do perfil Th2 como IL-4, que pode ativar um tipo de macrófago que estaria basicamente envolvido no reparo tecidual, estimulando fibroblastos e promovendo deposição de matriz extracelular que atuaria na formação do granuloma. Nessa regulação do granuloma a IL-10 interage com as citocinas do perfil Th1 como IFN- $\gamma$  suprimindo a deposição de colágeno (WYNN, 2004; MOSSER & EDWARDS, 2008). Além disso, a citocina IL-4 é envolvida na formação das células gigantes multinucleadas, originadas da fusão de monócitos/macrófagos, que estão presentes nos granulomas de *M. tuberculosis*, atuando na contenção destes microrganismos (McINNIS & RENNICK, 1988).

Atualmente a IL-10 é considerada como pertencente prioritariamente ao perfil das células T regulatórias (Treg), juntamente com a citocina IL-13. Entretanto a IL-10 pode ser produzida por células NK, monócitos, macrófagos, células dentríticas, linfócitos B,

principalmente por células Th2 e durante infecções crônicas pelas células Th1 (CARTER et al., 2011; MOTOMURA et al., 2011).

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

### 2.1.5 Tratamento e Profilaxia

O tratamento da linfadenite caseosa baseia-se na drenagem e extirpação dos linfonodos visíveis acometidos e da utilização de antibioticoterapia. Apesar do microorganismo *C. pseudotuberculosis* ser sensível a ampicilina, ao cloranfenicol, a lincomicina, a tetraciclina, a gentamicina, a penicilina, ao trimetropim, a ciprofloxacina e ao sulfametoxazol (ABREU et al., 2008), estes antibióticos não são eficazes em ultrapassar a cápsula fibrosa dos granulomas, o que torna a terapia ineficaz e de custo muito elevado (OLSON et al., 2002).

No que se refere à extirpação dos linfonodos acometidos, o principal entrave está na incapacidade da realização deste procedimento quando se tratar de LC interna, que acomete linfonodos e/ou outros órgãos internos do animal (ALVES & PINHEIRO, 1997). Ademais, a drenagem realizada nos linfonodos superficiais pode promover a contaminação do ambiente, uma vez que é possível encontrar um grande número de bactérias viáveis no material caseoso, na ordem de  $1 \times 10^6$  e  $5 \times 10^7$  UFC/g (BROWN & OLANDER, 1987 *apud* FONTAINE & BAIRD, 2008), podendo permanecer viável durante meses no solo, cerca, fezes, exudato purulento, carnes congeladas, locais úmidos e escuros, tesouras, pele, entre outros, o que pode tornar sua presença constante no ambiente de criação (RADOSTITS et al., 2002; ANDERSON, RINGS e PUGH, 2005).

Sendo assim, o controle deste agravo deve estar apoiado em medidas que possam inibir a entrada/disseminação de *C. pseudotuberculosis* no rebanho. Uma possibilidade está justamente no desenvolvimento de vacinas que sejam eficazes, além da identificação e eliminação de animais acometidos. Logo, o desenvolvimento de vacinas e de testes diagnósticos mais específicos constituem importantes instrumentos para o controle e

erradicação desta enfermidade (PIONTKOWSKI & SHIVVERS, 1998; PATON et al., 2003; DORELLA et al., 2006a; WINDSOR, 2011).

#### **2.1.5.1 Vacinas como ferramenta no controle da LC**

A vastidão dos estudos voltados ao desenvolvimento de novas vacinas, iniciados com as vacinações contra a varíola em 1796 por Edward Jenner (ABBAS & LICHTMAN, 2012), está relacionada com a quantidade de microrganismos, entre bactérias, vírus, parasitas e fungos, envolvidos no desdobramento de diversas patologias. Desta forma, o desenvolvimento de mecanismos que possam estimular e/ou mobilizar a resposta imunológica dos organismos frente a tais patógenos se torna uma importante ferramenta no combate a tais patógenos (HANDMAN, 1997). De certo, as vacinas propiciam uma proteção a infecções ao estimular o desenvolvimento de células direcionadas à destruição de um patógeno específico (HANDMAN, 1997; SANTOS et al., 1999). Assim, a busca por uma vacina eficaz para a LC é factível, este fato está baseado na observação de que animais infectados com *C. pseudotuberculosis* podem apresentar uma proteção frente a uma exposição subsequente. Entretanto, esta infecção primária faz com que os animais permaneçam com a bactéria (PÉPIN et al., 1988; PÉPIN et al., 1993; BRAGA et al., 2007) e possam, em situações adversas, reativar a infecção.

Uma vacina, para atuar como método profilático ideal para a LC, deve ser segura, induzir resposta imune protetora e ter o potencial de gerar memória imunológica (WAHREN & BRYTTING, 1997), ter baixo custo de produção, ser biologicamente estável e de fácil administração, além de acarretar pouco ou nenhum efeito colateral (MONTGOMERY et al., 1997). Ademais, é importante que se possa identificar/diferenciar os animais vacinados dos infectados. De acordo com o tipo de material usado para indução de resposta imune, as vacinas podem ser classificadas em três gerações (ABATH et al., 1998; GRIFFIN, 2002).

##### **2.1.5.1.1 Vacinas de primeira geração**

As vacinas de primeira geração são constituídas por parasitos mortos ou vivos atenuados. A principal motivação para a utilização deste material está na possibilidade de promover a proteção utilizando o microrganismo inteiro, entretanto sem a possibilidade de desenvolver a doença. A utilização de microrganismos mortos na busca de uma vacina para a

LC vem sendo avaliada por muitos pesquisadores, encontrando níveis de proteção diferentes, entretanto os resultados apresentam uma proteção frequentemente parcial, não evitando o surgimento da doença e sim que esta aconteça de forma mais branda (CAMERON et al. 1972; LEAMASTER et al., 1987; RIBEIRO et al., 1988; BROGDEN et al., 1990; BROGDEN et al., 1996).

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

O Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia vem avaliando o potencial de uma linhagem desta bactéria, denominada T1, desta bactéria como candidata a uma vacina viva atenuada por sucessivas passagens em meio de cultura específico, até o momento, níveis de proteção diferentes estão sendo alcançados e desta forma mais estudos precisam ser realizados (VALE, 2005; MOURA-COSTA et al., 2007; LIMA, 2009; SILVA, 2010).

Uma preocupação presente ao se utilizar como vacina microrganismos vivos é a possibilidade de reversão da virulência e desta forma ocasionar o surgimento da patologia ao invés de proteger o indivíduo. Por este motivo, a determinação dos riscos de reversão para o fenótipo virulento é sempre necessário para a liberação de uma vacina viva (HANDMAN, 2001).

#### **2.1.5.1.2 Vacinas de segunda geração**

As vacinas de segunda geração são compostas por microrganismos vivos geneticamente modificados, como protozoários, bactérias e vírus; frações de antígenos de

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

#### **2.1.5.1.3 Vacinas de terceira geração**

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

#### **2.1.6 Modelo Murino**

Os camundongos apresentam várias vantagens para serem considerados como os principais modelos/ferramentas experimentais, entre eles destaca-se a característica de ser um animal pequeno, pode ser mantido em espaços reduzidos, e por possui um período de gestação curto. Além disso, um ponto crucial é a riqueza de recursos e informações para a manipulação genética, proporcionando a construção de animais *knockout*, e assim a possibilidade de avaliação *in vivo* da ausência ou inclusão de genes. Outro ponto positivo é a possibilidade de

utilização de diferentes linhagens com características moleculares bem delimitadas, possuindo informações que estão disponibilizadas em bancos de dados sobre estas diferentes linhagens (GRUBB et al., 2004; CHORILLI et al., 2007; PETER et al., 2007; SUNDBERG et al., 2009; SCHOFIELD et al., 2010).

Ademais, camundongos infectados com *C. pseudotuberculosis* apresentam sinais clínicos, perfil de hemograma e bioquímica sérica, bem como as alterações histopatológicas em órgãos viscerais similares aos observados em pequenos ruminantes naturalmente infectados por este microrganismo (VALE, 2005; SOUZA, 2009; SILVA, 2010; JESSE, et al., 2011).

## OBJETIVOS

---

### 3.1 Objetivo Geral:

Avaliar e comparar aspectos da relação *parasito-hospedeiro* em diferentes linhagens de camundongos durante a infecção com uma linhagem atenuada e uma linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

### 3.2 Objetivos Específicos:

- a) Determinar a curva de mortalidade ocasionada pela infecção pelo uso de estirpe atenuada e/ou selvagem;
- b) Avaliar aspectos morfológicos, relacionados com o surgimento e localização de granulomas, como também avaliar o peso do baço nestes animais;
- c) Apresentar a cinética do padrão de migração celular para o local da infecção (cavidade peritoneal), quantificar o total de células encontradas nesta cavidade e realizar o diferencial celular. Avaliar a produção de citocinas produzidas após estímulo com antígenos secretados da estirpe atenuada de *C. pseudotuberculosis*;
- d) Apresentar a cinética da resposta imune adaptativa, na sua vertente celular, através da avaliação da imunofenotipagem e avaliar também a presença de citocinas no homogenato do baço.

## METODOLOGIA

---

Para realizar a avaliação dos aspectos da relação *parasito-hospedeiro* durante a infecção com uma estirpe atenuada ou uma estirpe selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos, o presente trabalho foi organizado em três experimentos. Previamente foi realizada a ampliação da biblioteca de bactérias presente no Laboratório de Microbiologia - ICS-UFBA, para tanto, e em parceria com a aluna de mestrado Italaney Fehlberga, foram avaliados 1.639 caprinos de cinco municípios do semiárido da Bahia quanto à presença de abscessos externos e, dos 59 animais que as apresentavam, amostras de sangue total e do material caseoso foram coletadas. O sangue foi destinado à realização dos ensaios imunoenzimáticos - ELISA, enquanto o conteúdo de 56 abscessos foi encaminhado para a realização da cultura de *Corynebacterium spp.* e da Reação em Cadeia de Polimerase multiplex direta (mPCR). Deste trabalho obteve-se a estirpe selvagem, denominada C57, utilizada nos experimentos posteriores, além de originar a dissertação de mestrado da mencionada aluna e a produção de um artigo submetido à *Veterinary Microbiology*, em setembro 2012. (Anexo 01).

A partir de então, três experimentos foram organizados da seguinte forma:

1. Estudo de aspectos da resposta imune em diferentes linhagens de camundongos após infecção com estirpe atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis*;
2. Avaliação da resposta imune em diferentes linhagens de camundongos após infecção com uma linhagem selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis*;
3. Caracterização da resposta imune após infecção com duas diferentes linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em camundongos *Balb/c*.

Estes experimentos serão apresentados em forma de manuscritos/capítulos, onde a descrição completa da metodologia, resultados e discussão estão especificadas em cada manuscrito/capítulo. Para manter a leitura mais fluida as referências bibliográficas estarão agrupadas no final desta tese.

**Estudo de Aspectos da Resposta Imune em Diferentes Linhagens de camundongos Após Infecção com Estirpe Atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.**

Ricardo Evangelista Fraga<sup>a,b</sup>; Heidiane Alves<sup>a</sup>; Milton Galdino Oliveira Neto<sup>a</sup>; Marcos da Costa Silva<sup>a</sup>; Andréia Pacheco<sup>a</sup>; Geraldo Pedral Sampaio<sup>a</sup>; Vera Vale<sup>a</sup>; Roberto Meyer<sup>a,c</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil. <sup>b</sup> Núcleo de Tecnologia em Saúde, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil. <sup>c</sup> Membros do INCT-DT/MCT/CNPq.

**\*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- 9966-9056

Fax: 55-71-3235-9682

Endereços de e-mail: ricardo.fraga@ufba.br (R. Fraga)

rmeyer@ufba.br (R. Meyer)

## Resumo

Este estudo foi realizado objetivando estabelecer o perfil da resposta imune durante o percurso da infecção por uma estirpe atenuada (T1) da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C.p.*) em diferentes linhagens de camundongos. *C.p.* é um microrganismo intracelular facultativo, responsável em estabelecer a linfadenite caseosa, doença infectocontagiosa crônica, que acomete principalmente os pequenos ruminantes. Para tanto, diferentes linhagens de camundongos foram infectados com  $10^7$ /ml de T1. Os animais foram divididos da seguinte forma: 28 *Swiss*; 28 *Balb/c*, 35 *C57Black/6* selvagem, 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para Óxido Nítrico (ON), 14 *C57Black/6-KO* para  $\text{INF-}\gamma$  e 14 *C57Black/6-KO* para IL-10. Cada linhagem de camundongo foi dividida em dois grupos (controle e teste). Após a infecção os animais *Swiss*, *Balb/c* e *C57Black/6* selvagens, foram avaliados nos tempos 07, 30, 60 e 120 dias. Enquanto que para os animais *C57Black/6* selvagens e *knockout* foram analisados aos 07 e 14 dias. Foi realizada a construção da curva de mortalidade; avaliação morfológica (presença de granuloma e peso do baço); avaliação do direcionamento celular para o local da infecção (quantidade total e diferencial de células peritoneais); produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ,  $\text{INF-}\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2, IL-17 por células aderentes peritoneais; imunofenotipagem (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>); bem como a mensuração das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27,  $\text{INF-}\gamma$  e TNF- $\alpha$  no homogenato do baço. Os resultados obtidos mostram que os animais *C57Black/6* são mais resistentes, uma vez que estes animais não apresentaram mortalidade, não apresentaram alterações morfológicas, apresentou um direcionamento celular para o local da infecção, como também a produção de citocinas por células fagocíticas compatíveis com uma atuação bem sucedida frente a infecções por microrganismos intracelulares facultativos, resposta oposta encontrada nas demais linhagens. Os animais KO-IL-10 demonstraram ser mais resistentes, enquanto que os animais KO-ON e KO- $\text{INF-}\gamma$  foram mais sensíveis à infecção por *C.p.*, demonstrando, desta forma, a importância/envolvimento do ON,  $\text{INF-}\gamma$  e da IL-10 para a eliminação ou estabelecimento da infecção.

**Palavras-chaves:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Camundongos. Resposta Imune.

## 1. Introdução

A bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* é um microrganismo gram-positivo, intracelular facultativo de macrófagos (KIMBERLING, 1988; PEKELDER, 2000; MEYER et al., 2002; RADOSTITS et al., 2002; ANDERSON, RINGS, PUGH, 2005) responsável em estabelecer a linfadenite caseosa, doravante (LC), doença infectocontagiosa crônica, que acomete principalmente os pequenos ruminantes (caprinos e ovinos), entretanto, pode eventualmente causar linfagite ulcerativa em equinos e dermatite ulcerativa em bovinos, búfalos e cervos (BENHAM et al., 1962; LOPEZ et al., 1966; BATTEY E TONGE, 1968; CAMERON & MINNAR, 1969; ZAKI, 1976; BATEY, 1986a). Esta doença é caracterizada pela formação de lesões granulomatosas, que podem acometer tanto regiões superficiais dos animais, como linfonodos, como também órgãos internos (BERNABÉ et al., 1991; DORELLA et al., 2006c; CRAWSHAW et al., 2008).

No Brasil, onde a pecuária de pequenos ruminantes está em constante expansão, principalmente na região Nordeste, e em especial no estado da Bahia, onde se encontra o maior rebanho de caprinos do País (BRASIL, 2010), a LC é responsável por grandes perdas econômicas (MOURA-COSTA, 2002). A LC compromete a pele do animal, além de poder ocasionar perda de peso, desordens reprodutivas (como abortos e mortalidade neonatal), diminuição da produção de carne e lã e condenação da carcaça (NAIRN & ROBERTSON, 1974; AYERS, 1977; ASHFAQ & CAMPBELL, 1979; BURREL, 1981; ALONSO et al., 1992).

Por se tratar de um microrganismo intracelular facultativo a imunidade celular é a principal responsável em eliminar as bactérias que residem nos fagócitos, atuando também, na eliminação de células infectadas. Além disso, a formação de granulomas é um mecanismo utilizado pelo sistema imune para tentar conter a disseminação deste microrganismo (VALE, 2000; BURMESTER e PEZZUTO, 2003).

A utilização de camundongos como modelo de estudo para a linfadenite caseosa se justifica, uma vez que estes animais são empregados em estudos para a compreensão de agravos crônicos (SUNDBERG et al., 2011), além de apresentarem sinais clínicos, perfil de hemograma e bioquímica sérica, bem como as alterações histopatológicas em órgãos viscerais similares aos observados em pequenos ruminantes (VALE, 2005; SOUZA, 2009; SILVA, 2010; JESSE, et al., 2011). Ademais, a possibilidade de realizar a remoção de um gene de

interesse nesta espécie, produzindo animais *knockout*, cada vez mais vem sendo aplicado com a finalidade de implementar a compreensão a respeito do envolvimento de determinados elementos da resposta imune frente a diversas infecções (SIMMONS et al., 1997; CHORILLI et al. 2007; PACHECO et al., 2012;).

A equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade federal da Bahia (ICS-UFBA) vêm trabalhando na tentativa de estabelecer uma vacina viva atenuada para esta enfermidade, para tanto, diferentes protocolos vem sendo estudados, tanto em modelo murino (VALE, 2005; SOUZA, 2009; SILVA, 2010), quanto em caprino (MOURA-COSTA et al., 2007; LIMA, 2009), alcançando diferentes níveis de proteção, no entanto, ainda é possível identificar a presença da formação de granulomas em alguns animais imunizados. Estes estudos direcionados para a determinação do tipo de resposta imune estabelecida, bem como a interferência de determinados elementos desta resposta, são importantes no aperfeiçoamento de candidatos à vacina a este patógeno, além de auxiliar na busca de métodos imunoterápicos e para o desenvolvimento de ensaios imunodiagnósticos. Desta forma, o presente trabalho teve como finalidade estabelecer o perfil da resposta imune durante o percurso da infecção por estirpe atenuada em diferentes linhagens de camundongos, e desta forma estabelecer o padrão de resposta imune em animais susceptíveis e resistentes a *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Além de avaliar o envolvimento do oxido nítrico, interferon gama (INF- $\gamma$ ) e da citocina IL-10 no início do processo infeccioso.

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1 Corynebacterium pseudotuberculosis*

A linhagem T1 deste microrganismo para a infecção dos animais e a produção de antígenos secretados (AsT1). Esta linhagem foi isolada de um caprino naturalmente infectado da região de Santa Luz-BA e doado pelo Dr. Artur Hage, pesquisador da EBDA, para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA) no ano 2000, onde foi realizada a identificação pelo teste “API coryne” (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França), e após sucessivas culturas em meio específico foi

considerada atenuada por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa que estirpes recentemente coletadas de caprinos naturalmente infectados. A partir de então, esta linhagem é mantida, na coleção do Laboratório de Microbiologia do ICS – UFBA, sendo utilizada em diversos ensaios laboratoriais por promover uma infecção mais branda tanto em caprinos como em camundongos infectados experimentalmente.

Para a produção das proteínas secretadas (AsT1), quatro litros de cultura da T1 em meio de infusão de cérebro e coração - BHI - (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA); cultivados a 37°C, por 48 horas; foram utilizados, seguindo-se protocolo estabelecido por Paule *et al.*, (2003). Resumidamente, o cultivo foi centrifugado a 10.000xg por 15 minutos, seguido de filtração em membrana de diálise durapore em PVDF de 0,45µm (Millipore, Indústria e Comércio LTDA, São Paulo-SP, Brasil), com o intuito de eliminar as bactérias presentes no meio. Em seguida, o sobrenadante foi fracionado em um procedimento composto por três fases (“Three Phase Partitioning” - TPP). Primeiro ocorreu a saturação com 30% de sulfato de amônia (VETEC Química Final LTDA – Rio de Janeiro-RJ) a temperatura ambiente, sob leve agitação, em seguida o Ph foi ajustado para 4,0, e foi acrescentado n-butanol (VETEC Química Final LTDA – Rio de Janeiro-RJ) na mesma proporção do volume do meio de cultura BHI (04L), seguido de uma agitação vigorosa durante um minuto. Este material então foi mantido em repouso durante uma hora, para promover a precipitação protéica. O segundo passo correspondeu à recuperação do precipitado, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, e novamente centrifugado a 1350xg durante 10min. e a interface foi coletada e dissolvida em cinco ml de tampão Tris 20 mM, pH 7,4. No terceiro passo, este material foi então submetido à diálise contra Salina Tamponada com Fosfato - PBS, pH 7.2, realizada em três banhos de 08 horas a 4°C. Para a determinação protéica foi empregado o método de Lowry (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Califórnia-USA). As amostras, antes de serem armazenadas a – 20°C, foram acondicionadas em um saco contendo gelo, e foram submetidas à esterilização por exposição à luz ultravioleta durante 15 min.

Com a finalidade de promover a infecção, tanto dos animais testados, quanto das células aderentes da cavidade peritoneal, a quantificação bacteriana foi realizada, seguindo-se o protocolo estabelecido por Pedral (2012). Resumidamente, três ml, de uma cultura mantida durante 48h a 37°C de 250 ml, foram retirados. Este material foi lavado duas vezes, em solução salina, através de centrifugações de 04 min. a 8.000xg. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescido o SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e incubou-se por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Nova lavagem foi realizada

para a remoção dos reagentes e o sedimento bacteriano foi ressuspensão e mensurado no citômetro de fluxo. Para isso, foram utilizados tubos TruCount (Becton Dickson, EUA), contendo sedimento de microesferas fluorescentes, com a quantidade de *beads* constantes em cada lote. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo: Bactérias totais =  $(N^0 \text{ beads eventos bactérias} / N^0 \text{ de beads A+B}) \times N^0 \text{ de Beads por } \mu\text{l}$ .

## 2.2 Animais

Foram utilizadas diferentes linhagens de camundongos, sendo: da linhagem heterogênea - 28 *Swiss*; da linhagem isogênica - 28 *Balb/c*, 35 *C57Black/6* selvagem, 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para Óxido Nítrico (ON), 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para IFN-gama e 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para interleucina dez (IL-10); perfazendo um total de 133 animais, com idade entre 06 - 08 semanas, de ambos os sexos. Os animais da linhagem *C57Black/6* (selvagem e *knockout*) foram adquiridos no Biotério da Fundação Oswaldo Cruz – RJ; os animais da linhagem *Balb/c* no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ-Salvador-BA) e os animais da linhagem *Swiss* do Biotério da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (MEV-UFBA).

Os animais foram alojados em caixas de 30x19,5x12 cm, quatro a seis animais por caixa, ou em caixas de 41x34x16 com 20 animais cada, durante todo o período do experimento, no Biotério do Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA), sob condições adequadas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e de umidade (50 - 60 %). Os camundongos foram mantidos com alimentação e água *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, sob protocolo nº 006/2010.

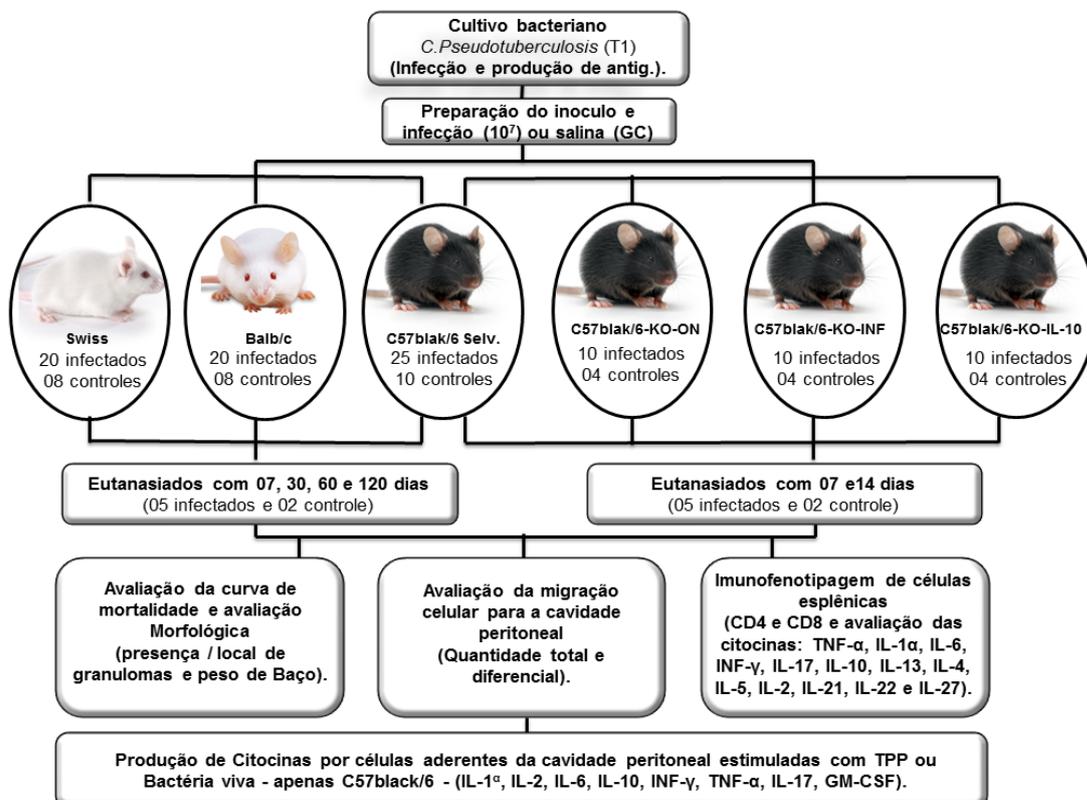
## 2.3 Infecção

Cada linhagem de camundongo foi dividida em dois grupos (controle e teste), onde os animais *Swiss* e *Balb/c* tiveram 08 animais controle e 20 animais infectados, já os animais *C57Black/6* selvagens foram divididos em 10 controles e 25 infectados. Por sua vez, os

animais *C57Black/6 knockout* foram agrupados em 04 controles e 10 infectados. Os animais foram infectados com a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis* na concentração de  $10^7$ /ml diluídos em um (01) ml de salina (ISO FAR, Duque de Caxias, RJ) que foi inoculado pela via intraperitoneal. Enquanto que, os animais controle receberam, pela mesma via, um (01) ml de salina (ISO FAR, Duque de Caxias, RJ).

Após a infecção os animais do experimento 01, que se referiam aos camundongos *Swiss*, *Balb/c* e *C57Black/6* selvagens, foram avaliados nos tempos 07, 30, 60 e 120 dias. Enquanto que para os animais do experimento 02, *C57Blak/6* selvagens e *knockout*, foram analisados aos 07 e 14 dias. Em cada tempo examinou-se cinco (05) animais infectados e dois (02) animais controles, de cada grupo estudo, foram eutanasiados por deslocamento cervical (desenho experimental 01).

### Desenho experimental manuscrito/capítulo 01



## 2.4 Curva de mortalidade

Para a caracterização da curva de mortalidade dos camundongos infectados com a T1, foram utilizados os animais referentes ao último dia de análise (120 dias para os animais do experimento 01 e 14 dias para o experimento 02), que correspondia a cinco (05) animais infectados e dois (02) animais controle. As caixas que reuniam estes camundongos eram inspecionadas diariamente para a observação de possíveis óbitos.

## 2.5 Avaliação Morfológica

### 2.5.1 Presença e Localização de Granuloma

Em seguida à eutanásia os camundongos foram vistoriados, tanto externamente quanto na abertura das cavidades peritoneal e torácica, para a observação da existência de granulomas, bem como do local de sua ocorrência.

### 2.5.2 Determinação do peso do baço

Após a eutanásia dos animais, em cada ponto avaliado, o peso corporal, seguido pelo do baço, foram obtidos utilizando Balança de precisão (Marte Balança e Aparelhos de Precisão LTDA, São Paulo-SP). A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%.

## 2.6 Avaliação da Resposta Imune

A avaliação da resposta imune das diferentes linhagens de camundongos infectados com a bactéria T1 de *C. pseudotuberculosis* foi estimada tanto em relação à resposta imune inata, quanto em relação à resposta imune adaptativa, na sua vertente celular.

### 2.6.1 Resposta Imune Inata

#### 2.6.1.1 Avaliação da migração celular para a cavidade peritoneal

A avaliação da migração celular para a cavidade peritoneal (local da realização da injeção) foi realizada através da quantificação total de células e do diferencial destas. Após a eutanásia, procedeu-se a assepsia do abdômen e exposição do peritônio, e foi injetado, em condições assépticas, 1,5mL de salina estéril (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ). Em seguimento, foi realizada uma massagem, por em média 30 segundos, e este material foi recuperado. Após definição do volume readquirido, este foi acondicionado em microtubos eppendorf, dos quais 40µl foram utilizados para contagem de células totais através de um contador automático de células (Hemocytometer CELM cc-530, CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri-SP), 60µl foram utilizados na preparação de citoesfregaço, em duplicata, através de centrifugações de 16 minutos a 500xg em temperatura ambiente, utilizando uma citocentrífuga de bancada Presvac CT12 (Prevac, Balneário Camboriú - Santa Catarina fabricante), e o restante da suspensão foi encaminhada para a cultura celular dos animais *C57Black/6*.

As lâminas do citoesfregaço foram coradas com uma mistura dos corantes hematológicos *Wright* e *Giemsa* (Sigma Chemical Co., EUA). Resumidamente, as lâminas foram cobertas com 15 a 20 gotas do corante, deixando-o agir por três minutos, seguidamente foram acrescentados 20 gotas de água destilada, por 12min., e então lavadas em água corrente. O perfil das células da cavidade foi determinado através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal, utilizando-se para isso um microscópio Biológico binocular modelo L-1000 bac (Bioval, Bauru-SP) em objetiva de imersão (aumento de 1000X).

#### 2.6.1.2 Avaliação da Produção de Citocinas por Células Aderentes

Com o propósito de caracterizar as citocinas produzidas por células aderentes após o estímulo com antígenos secretados ou com a bactéria T1 viva, células da cavidade peritoneal dos camundongos *C57Black/6*, foram cultivadas. Para isso, as células recuperadas, como descritas anteriormente, foram lavadas duas vezes utilizando-se salina (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ) através de centrifugações de 1500xg, por 10 minutos, a 4°C. Ao final, cada sedimento celular foi ressuspensão em um mL de meio RPMI 1640 suplementado, e em seguida realizou-se nova contagem de células utilizando o contador automático (Kacil Indústria e Comércio LTDA, Recife-PE). Estas foram ajustadas para  $2 \times 10^5$ /ml e incubadas em placas de 24 poços, de poliestireno, de fundo chato (Costar Corning Inc., Nova Iorque,

EUA), a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sup>2</sup>, por 24 horas em incubadora (Costar Corning Inc., Nova Iorque, EUA).

As células dos animais *C57Black/6* selvagens infectados com a linhagem T1 após 14 dias de infecção e os animais controles dos pontos 14 e 30 (logo 05 animais infectados e 04 controles) foram estimuladas com antígeno secretado (AsT1), para isso, após 24hr do plaqueamento, os poços foram lavados, com o objetivo de remover as células não aderentes, e, posteriormente, estimuladas com apenas meio, ou 10µg/mL de Lipopolisacarídeo de *Escherichia coli*-LPS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), referente ao controle positivo, ou 40µg/mL do antígeno da linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*. As placas foram incubadas por mais 24hr nas mesmas condições anteriores e, depois disso, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C.

Por sua vez, as células dos animais *C57Black/6* selvagem e KO-INF- $\gamma$  e KO-IL-10, também referentes ao 14° dia de infecção, foram cultivadas, após a remoção das células não aderentes, na proporção de 1:5 (uma célula aderente para cinco bactérias vivas) com T1 em meio RPMI suplementado, sem a presença de antibiótico. O grupo *C57Black/6*-KO-ON não foi avaliado uma vez que, neste ponto estudado, o grupo infectado possuía apenas um animal. Para isso, bactérias T1 viáveis foram quantificadas, como descrito anteriormente, e adicionadas a cultura celular após 24hr, depois de 1h30 min procedeu-se a coleta do sobrenadante e posterior armazenamento a -20°C. Em seguimento, as células aderidas foram ressuspensas, utilizando tripsina, para realizar a construção de citoesfregaço, e assim confirmar a infecção/fagocitose pelo microscópio óptico, após coloração com uma mistura dos corantes hematológicos *Wright* e *Giemsa*, como descrito anteriormente.

As citocinas mensuradas nos sobrenadantes das culturas foram IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2, IL-17, produzidas por macrófagos e outras células aderentes. Estas citocinas foram detectadas por Citometria de Fluxo utilizando *Kit* comercial TH1/TH2 mouse 10 plex – Flow Cytomix (eBioscience: Bender MedSystems GmbH). Resumidamente, os padrões das citocinas avaliadas foram reconstituídos em água destilada estéril de acordo com a concentração previamente recomendada no *Kit*, para serem utilizadas na elaboração de um *mix* de citocinas, que por sua vez, foi empregado na elaboração de uma diluição seriada, utilizada como a curva padrão do ensaio. Posteriormente, foi elaborado o *mix* das *beads* de captura, onde as *beads* referentes a cada citocina analisada foram agrupadas em um tubo Falcon de 15ml e centrifugadas a 7500xg por 05 minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente desprezado e o sedimento resuspenso com o mesmo volume de tampão de ensaio. Seguidamente, o *mix* do conjugado biotilado foi preparado também diluído em

tampão de ensaio. Desta forma, o experimento foi realizado, adicionando em tubos previamente identificados a seguinte ordem: padrões das citocinas ou as amostras, em seguida o *mix* de *beads* e por último o *mix* de conjugados biotinilados. Estes foram incubados ao abrigo de luz e a 4°C por duas (02) horas. Findado o período de incubação, foi adicionado um (01)ml do tampão de ensaio em cada tubo que foi seguido por uma centrifugação a 7500xg durante 05 minutos. Seguidamente, foi removido 700 µL do sobrenadante e novamente lavado com o mesmo volume de tampão, que foi seguido da remoção do sobrenadante e posterior adição de 20 µL de streptoavidina-PE. Os tubos foram então homogeneizados e incubados no escuro por uma (01) hora, ao passo que, findado este período, as amostras foram novamente lavadas duas vezes e por fim resuspensas em 500µL de tampão de ensaio e acondicionadas isentas da luz a 4°C, *overnight*, para posterior leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o FlowCytomix Pro Software, conforme orientações do fabricante.

## 2.6.2 Resposta Imune Adaptativa

A avaliação da resposta imune adaptativa, na sua vertente celular, foi realizada através da mensuração da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> presentes no baço no momento da eutanásia de cada animal, através da imunofenotipagem realizada pela citometria de fluxo, além da quantificação de citocinas presentes neste órgão.

O baço de cada animal foi removido e transferido para uma placa de petri de 40x12mm, e após a sua pesagem, foi removido um fragmento de 30mg que foi macerado em 500 µL de solução inibidora de proteases (Sigma Aldrich Brasil Ltda.) gerando uma suspensão celular. Cada suspensão foi submetida a centrifugação a 450xg por 10 minutos à 4°C. A partir de então, o sobrenadante das amostras foi adequadamente armazenado à – 20°C para serem utilizados na quantificação de citocinas. Enquanto que, o sedimento celular foi ressuspense em três (03) ml de salina, 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.

A imunofenotipagem foi realizada pela avaliação da expressão das proteínas CD3, CD4 e CD8 na superfície celular. Para tanto, foram utilizados anti-CD3 conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-CD8a conjugado com PE-Cy@5.5 e anti-CD4 conjugado com R-PE (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Todos os anticorpos monoclonais (AcMO) foram

previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso. As células esplênicas foram ajustadas em 500.000 células (eventos) diluídas em 500 µL do tampão de ensaio, em seguida os anticorpos monoclonais foram acrescentados e esta mistura foi incubada, em câmara escura, durante 15 minutos. Findado o período de incubação, foi adicionado um (01) ml do tampão de ensaio em cada tubo, e em seguida foi realizada uma centrifugação a 7500xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e acrescentado 500µL de tampão de ensaio. 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).

A dosagem das citocinas presentes no homogenato do baço foi realizada através de ensaio para detecção por Citometria de Fluxo, utilizando-se para isso, *Kit* comercial 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, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , como descrito anteriormente.

## 2.7 Análise Estatística

Com o objetivo de avaliar aspectos da relação *parasito-hospedeiro* durante a infecção com linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos, considerando a avaliação morfológica, a avaliação da migração para a cavidade peritoneal, a imunofenotipagem de esplenócitos e a dosagem de citocinas, tanto presentes em células aderentes, quanto no homogenato do baço, 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 (BIOSTAT, 2007; FISHER, 1993) e as tendências centrais dos grupos independentes, dois a dois, foram comparadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney (CALLEGARI-JACQUES, 2003) quando os grupos avaliados apresentavam pelo menos três valores. O valor fixado para significância estatística foi de  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Curva de Mortalidade

A curva de mortalidade foi avaliada pela vistoria diária dos camundongos até o último dia de eutanásia de cada experimento. No experimento 01, que se refere aos animais *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*, foram possíveis relatar, para os animais da linhagem *Balb/c*, dois óbitos (dias 94 e 117), e para o grupo *Swiss* nos dias 78, 95 e 108 (Figura 01). No experimento 02, que corresponde aos animais *C57Black/6* selvagem e *knockout* foram identificados óbitos nos dias 04, 10, 12 e 13 dos animais *C57Black/6-KO-ON* (Figura 02).

#### 3.2 Avaliação Morfológica

A avaliação morfológica foi estimada em relação ao surgimento de granulomas, bem como em relação aos locais onde sucederam a sua ocorrência. Além disso, foi realizada uma avaliação referente ao peso do baço.

No experimento 01 os animais *Balb/c* apresentaram granulomas com 30 dias (02 animais em relação aos 05 – 02/05) e com 120 dias (01/03), e em cada um destes foi observado apenas um granuloma em linfonodo. Nos *Swiss* foram identificados com 30 dias (03/05), com 60 dias (01/05) e com 120 dias (01/02), acometendo 03 linfonodos, 01 no fígado e 02 no tecido subcutâneo (tabela 01 e 02). No experimento 02 foi possível relatar nos animais *C57Black/6-KO-ON*, com 07 dias (04/05) e 14 dias (01/01), surgindo mais de um por animal, sendo: 06 em linfonodos, 03 na cavidade abdominal, 01 no fígado e 01 na musculatura do diafragma, perfazendo ao total 11 granulomas. Nos *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  pode-se assinalar a presença de granulomas em todos os animais avaliados no dia 14 (05/05), envolvendo 14 linfonodos, 01 fígado, 02 rins, 01 pulmão e 03 subcutâneos, em um total de 21 granulomas (tabela 03 e 04).

Os valores encontrados referentes à relação entre o peso corporal e o peso do baço dos animais do primeiro experimento estão apresentados na figura 03, onde a comparação entre os dias da infecção com o grupo controle, caracterizado pela união de todos os animais controles eutanasiados com 07, 30, 60 e 120 dias, realizada por Kruskal-Wallis, revelou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0209$ ) apenas no grupo *Balb/c*. Neste grupo, a comparação das médias entre os dias apresentou a seguinte relação: 120d = 60d > Grupo Controle (GC) = 07d = 30d. Na figura 04 são avaliados os resultados referentes ao segundo experimento, em que os animais *C57Black/6-KO-INF $\gamma$*  apresentaram diferença com  $p =$

0,0066, e na avaliação pós-teste revelou a seguinte relação: 14d > GC. As médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) de cada grupo pesquisado encontram-se no apêndice A

### 3.3 Avaliação da Resposta Imune

Para a caracterização da resposta imune das diferentes linhagens de camundongos estudadas nesta análise foram avaliadas a resposta imune inata, com a determinação da quantidade total, bem como o diferencial, de células da cavidade peritoneal e as produções de citocinas por estas células. Assim como a imunofenotipagem para  $CD4^+$  e  $CD8^+$  e as citocinas produzidas no macerado do baço. Todas as médias aritméticas com os respectivos desvios padrões ( $X \pm SD$ ) dos dados que se seguem estão disponíveis no apêndice A

#### 3.3.1 Avaliação da Resposta Imune Inata

A avaliação da resposta imune inata foi caracterizada pela quantificação total e diferencial de células recuperadas da cavidade peritoneal após a eutanásia dos animais. A Figura 05 representa os valores encontrados da quantificação total referentes ao experimento 01, no qual é possível notar a diferença estatística significativa nos animais *Balb/c*, com  $p = 0,0084$  e a seguinte relação pós-teste: 07d > GC = 30d; 30d < 60d = 120d. Já para os animais *C57Black/6* foi possível observar  $p = 0,0228$ , e a seguinte relação: 120d > GC = 07d = 30d.

Os valores relacionados com o diferencial destes grupos apresentaram, na avaliação por Kruskal-Wallis, os seguintes valores estatísticos para a linhagem *Balb/c*: Macrófagos ( $p = 0,0087$ ), tendo como pós-teste a relação: 07d = 120d > GC = 30d; Linfócitos ( $p = 0,0288$ ), apresentando: GC = 07d = 120d = 60d < 30d e Neutrófilos ( $p = 0,0006$ ), com pós-teste: 07d > GC, 30d, 60d, 120d e 120d > GC = 60d; 30d > 60d. Para os animais da linhagem *C57Black/6*, os valores estatísticos encontrados foram para Linfócitos ( $p = 0,0015$ ), e relação: GC = 60d = 120d > 07d = 30d e os Neutrófilos ( $p = 0,0005$ ), e pós-teste: 07d = 30d > GC = 60d = 120d. Já a linhagem *Swiss* não apresentou diferença significativa entre o grupo (Figura 06).

Ao ser avaliada a quantificação total das células peritoneais do experimento 02, com os animais *C57Black/6* selvagem e *knockout*, foi encontrado, nos animais *C57Black/6-OK-ON* ( $p = 0,0327$ ) e relação: 07d > GC; *C57Black/6-OK-INF- $\gamma$*  ( $p = 0,0059$ ) e pós-teste: 07d > 14d > GC e em *C57Black/6-OK-IL-10* ( $p = 0,0444$ ), tendo 14d > 07d (Figura 07).

Na figura 08 é visto o diferencial referente ao experimento 02, nela é possível atentar para os seguintes achados: *C57Black/6* selvagem com neutrófilos ( $p = 0,0031$ ) onde  $14d > 07d > GC$ ; o grupo *C57Black/6*-OK-ON com os neutrófilos ( $p = 0,0266$ ) com  $07d > GC$ ; os animais *C57Black/6*-OK- $INF\gamma$  para os macrófagos ( $p = 0,0052$ ) sendo o  $07d > 14d > GC$ , linfócitos ( $p = 0,0110$ ) onde  $07d > 14d = GC$ , e os neutrófilos ( $p = 0,0031$ ) e o  $07d > 14d > GC$ ; para o grupo *C57Black/6*-OK-IL-10 os neutrófilos com ( $p = 0,0039$ ), tendo o  $14d > 07d > GC$ .

### 3.3.1.1 Avaliação da produção de Citocinas por Células Aderentes

As células da cavidade peritoneal dos camundongos *C57Black/6* foram cultivadas com o intuito de caracterizar as citocinas produzidas por células aderentes após o estímulo com antígenos secretados ou com a bactéria T1 viva.

Na figura 09 é demonstrado os resultados alcançados quando células dos camundongos *C57Black/6* selvagens foram cultivadas com  $40\mu\text{g/ml}$  de antígenos secretados da bactéria T1. É possível observar uma diferença estatística, através do teste de Kruskal-Wallis, na produção das seguintes citocinas: IL-1 $\alpha$  ( $p = 0,0050$ ), e o pós-teste realizado pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney, entre as células que receberam apenas meio com as que foram estimuladas com os antígenos da T1, no grupo infectado possui  $p = 0,0119$ ; IL-2 ( $p = 0,0048$ ), onde no pós-teste o grupo controle apresentou um  $p = 0,0265$ , e o grupo infectado um  $p = 0,0178$ ; IL-6 ( $p = 0,0271$ ) com pós-teste para o grupo infectado com  $p = 0,0119$ ; IL-10 ( $p = 0,0041$ ) onde a relação das células que receberam apenas meio ou receberam os antígenos secretados do grupo controle possuem um  $p = 0,0286$  e no grupo infectado  $p = 0,0119$ ;  $INF-\gamma$  ( $p = 0,0267$ ) e pós-teste para o grupo infectado com  $p = 0,0459$  e a citocina TNF- $\alpha$  ( $p = 0,0133$ ) apresentando no pós-teste para o grupo infectado um  $p = 0,0097$ . Não foi observada a produção da citocina IL-17 e nem uma diferença estatística para as células estimuladas com os antígenos para a GM-CSF.

Ao se avaliar as culturas das células dos animais *C57Black/6* selvagem e KO- $INF-\gamma$  e KO-IL-10 é possível detectar a produção das citocinas: TNF- $\alpha$  para os animais *C57Black/6* selvagem ( $p = 0,0347$ ) e pós-teste no grupo infectado com  $p = 0,0294$ , para o grupo *C57Black/6*-KO- $INF-\gamma$  ( $p = 0,0168$ ) com pós-teste no grupo infectado de  $p = 0,0119$  e a produção da citocina GM-CSF para os animais *C57Black/6*-KO-IL-10 ( $p = 0,02680$ ) no grupo infectado, com  $p = 0,097$ . Não foi observada uma diferença estatística significativa ao se analisar as citocinas: IL-1 $\alpha$ ,  $INF-\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 (Figura 10).

A avaliação da infecção/fagocitose foi confirmada pela visualização de macrófagos com vacúolos intracelulares e presença de bactérias no citoplasma (Figura 11)

### 3.3.2 Avaliação da Resposta Imune Adaptativa

As médias de intensidade de fluorescência (MIF) são avaliadas nas figuras 12 e 13. Onde os valores apresentados na figura 12 referem-se aos dados do primeiro experimento, onde, para a MIF de CD4, os valores encontrados nos animais *Balb/c* apresentam uma diferença estatística, com  $p = 0,0393$ , pelo teste de Kruskal-Wallis, apresentando a seguinte relação:  $GC = 60d = 120d > 07d = 30d$ , pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney. Os animais *Swiss* com  $p = 0,0056$ , e pós-teste revelando que:  $60d > GC = 07d = 30d = 120d$ . Para o MIF de CD8 neste mesmo experimento foi possível detectar uma diferença estatística nos animais *Swiss*, onde  $60d > GC = 07d = 30d$ .

O MIF da expressão de CD4 nos animais do segundo experimento apresentaram diferença no grupo *C57Black/6* selvagem ( $p = 0,0159$ ) tendo o  $07d > 14d = GC$ . O MIF para CD8 não apresentou diferenças estatísticas nos grupos analisados (Figura 13).

Para a análise da produção das citocinas, elas foram agrupadas em citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17), citocinas anti-inflamatórias e Th2 (IL-10, IL-13, IL-4 e IL-5), e citocinas relacionadas ao direcionamento do perfil Th1 e Th2 dos linfócitos T (IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27). No primeiro experimento é possível observar uma diferença estatística entre as produções de TNF- $\alpha$  do grupo *Swiss* ( $p = 0,0339$ ), com  $60d < GC$  e da IL-1 $\alpha$  para os animais *Balb/c* ( $p = 0,0177$ ), revelando:  $GC = 07d < 60d$ , e para *C57Black/6* ( $p = 0,0355$ ), mostrando que  $07d = 30d > GC$ . Não foi possível detectar diferenças para IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 (figura 14). Apresentaram diferença estatística também a citocina IL-10, no grupo *Swiss* ( $p = 0,0443$ ), apresentando no pós-teste:  $60d < GC = 07d$  e a IL-5 para os animais *C57Black/6* com  $p = 0,0361$  e revelando, no pós-teste, a seguinte relação:  $60d > GC = 30d = 120d$ . Não foi detectada diferença para as citocinas IL-13 e IL-4 (figura 15). Já para o ultimo grupo das citocinas (IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27), apenas a IL-27 apresentou diferença para os animais *C57Black/6* ( $p = 0,0443$ ), onde  $120d > GC = 30d$ , e para a linhagem *Swiss* ( $p = 0,0016$ ) revelando que o  $GC > 07d = 30d = 60d$  (figura 16).

No experimento 02 é possível perceber uma diferença na produção da citocina IL-1 $\alpha$ , pelos animais *C57Black/6-KO-INF $\gamma$*  ( $p = 0,0236$ ), revelando que  $07d > 14d = GC$  (figura 17). A citocina IL-13 apresentou diferença para o grupo de animais *C57Black/6* selvagem, com  $p = 0,0188$ , tendo o  $14d = GC > 07d$ . Não foi observado diferenças para IL-10, IL-4 e IL-5

(figura 18). A citocina IL-21 apresentou diferença significativa ( $p = 0,0203$ ) para o grupo *C57Black/6-KO- $\text{INF}\gamma$* , revelando, no pós-teste, que  $14d < GC$ , já a citocina IL-22, no grupo *C57Black/6* selvagem, apresentou  $p = 0,0329$ , tendo  $14d > 07d = GC$  (figura 19).

#### 4. Discussão

Com vistas na caracterização do perfil imunológico após infecção com estirpe atenuada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos, no presente trabalho, foi avaliada a resposta imune de camundongos em duas etapas. A primeira abordou os animais *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss* e a segunda os animais *C57Black/6* selvagem e *knockout* para ON,  $\text{INF-}\gamma$  e IL-10, durante o percurso da infecção com uma linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis*, denominada T1.

Esta estirpe foi considerada atenuada pela diferença estabelecida na infecção ao ser comparada com outras linhagens da bactéria também isoladas de caprinos naturalmente infectados, onde a linhagem T1 apresentava uma infecção mais branda em modelo murino (VALE, 2005; SOUZA, 2009; SILVA, 2010). Como também, no modelo caprino, uma vez que, a avaliação da resposta imune humoral (produção de IgG específica) e celular (produção de  $\text{INF-}\gamma$ ) não foram detectadas após a inoculação de  $2 \times 10^6$  UFC (MOURA-COSTA et al., 2007), ou  $2 \times 10^5$  e  $2 \times 10^7$  UFC (LIMA, 2009) desta bactéria.

Os objetivos destes estudos estavam na tentativa de tipificar esta linhagem (T1) como candidata para a produção de uma vacina viva atenuada (vacinas de primeira geração). Porém, estudos utilizando  $8 \times 10^4$  UFC em camundongos *Balb/c* (SIMMONS et al., 1997) e  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^8$  em ovinos (SIMMONS et al., 1998) de mutante do gene *aroQ* de *C. pseudotuberculosis*, observam que estes mutantes são altamente atenuados, e por este motivo permanecem pouco tempo no animal, fato este que prejudica o estabelecimento de uma resposta imune protetora. Este gene é responsável por codificar uma enzima do tipo 3-dehidroquinase que está envolvida com a biossíntese de aminoácidos aromáticos da bactéria. Desta forma, um candidato para ser utilizado como vacina atenuada deve permanecer no animal o tempo necessário para estimular o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva, como demonstrado pela estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis* neste trabalho.

Um dos parâmetros para caracterizar a infecção de camundongos pelo *C. pseudotuberculosis* é a determinação da curva de mortalidade, uma vez que se trata de um

microrganismo que estabelece uma infecção crônica, sendo assim, para a avaliação dos aspectos da infecção entre a bactéria e o hospedeiro, é necessária a utilização de uma dose que permita o estabelecimento da doença de forma crônica. No presente trabalho, utilizando  $1 \times 10^7$  de T1, foi observado óbito nas linhagens *Balb/c* (dois animais) e *Swiss* (três animais) ao se avaliar a infecção durante 120 dias. Em compensação, os animais *C57Black/6* selvagem demonstraram uma maior resistência à infecção, uma vez que, não foi observado óbito em nenhum animal desta linhagem. Estes dados, relacionados com a sensibilidade da infecção em animais *Balb/c* e *Swiss*, corroboram com os resultados encontrados por Pinho e colaboradores (2009) que avaliando a proteção desenvolvida por um candidato a vacina (proteína recombinante rHSp60) em camundongos *Balb/c* ao infectar, tanto o grupo controle como o grupo de animais vacinados, com  $1 \times 10^6$  UFC de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal, necessitou eutanasiar os cinco animais do grupo controle em três dias de infecção devido à morbidade apresentada por este grupo, e o grupo vacinado apresentou mortalidade de 100% no 11º dia pós-infecção. Nos experimentos de Simmons e colaboradores (1997), também avaliando camundongos *Balb/c* estabelecem a concentração de  $1 \times 10^6$  UFC como sendo a máxima tolerada por esta linhagem. Os animais *Swiss* foram analisados após a infecção com  $2 \times 10^8$  UFC de diferentes linhagens de *C. ulcerans* que apresentaram 50%, 53% ou 70% de animais mortos com 30 dias após a infecção (DIAS et al., 2011). Ademais, estes resultados fortalecem o entendimento da atenuação natural da bactéria T1, uma vez que mesmo com uma infecção de  $1 \times 10^7$ , foram registrados poucos óbitos.

Todavia, ao se avaliar a capacidade de promover uma infecção letal nos animais *C57Black/6* selvagens e *knockout* para ON, INF- $\gamma$  e IL-10 foi identificado que apenas a ausência do óxido nítrico promovia uma mortalidade nos animais (quatro dos cinco estudados) com 14 dias de infecção, período em que todos os animais foram eutanasiados para avaliação da resposta imune. Simmons e colaboradores (1997) avaliando camundongos *knockout* para o receptor do INF- $\gamma$  infectados  $1 \times 10^4$  UFC de *C. pseudotuberculosis*, tanto com uma linhagem virulenta quanto com linhagens modificadas geneticamente, não observaram diferenças entre os animais selvagens e *knockout* em relação à mortalidade, entretanto nos animais *knockout* foram recuperadas mais bactérias no fígado e no baço. Este resultado é similar ao aqui apresentado, uma vez que, também não foram observados óbitos nos animais *knockout* para INF- $\gamma$ , entretanto foi observado um grande número de granulomas distribuídos em diversos órgãos, incluindo o aumento significativo do peso do baço.

Por outro lado, em animais *knockout* para o INF- $\gamma$  ou para a citocina IL-12 infectados com  $1 \times 10^6$  UFC de *Brucella abortus* ocorreram óbitos precoces ao se comparar com os animais selvagens, principalmente dos *knockout* para o INF- $\gamma$  onde os quais morreram com 16 dias de infecção, enquanto que os selvagens sobreviveram por mais de 50 dias (BRANDÃO et al., 2012). Resultados similares foram identificados com a *Bordetella pertussis* (MAHON et al., 1997), como também em animais *knockout* para a linfotóxina  $\alpha$  e para o TNF desafiados com *Mycobacterium tuberculosis* (BEAN, et al., 1999; ROACH, et al., 2001; ALLIE, et al., 2010). Esta diferença entre o grau de letalidade observado quando animais *knockout* para citocinas relacionadas com uma resposta celular são infectados com bactérias intracelulares pode estar ancorada em características individuais dos patógenos estudados, ademais, os óbitos encontrados por estes autores foram constatados a partir do 16º dia, enquanto que os animais deste presente estudo foram eutanasiados com 14 dias após a infecção.

Jesse e colaboradores (2011), avaliando as alterações histopatológicas de 15 camundongos infectados, por via peritoneal, com  $1 \times 10^9$  UFC de *C. pseudotuberculosis*, descrevem que os achados histológicos dos órgãos viscerais são semelhantes às alterações histopatológicas das ovelhas naturalmente infectadas. Deste modo, ao se avaliar a formação dos granulomas em caprinos experimentalmente infectados, é possível observar numerosos, entretanto pequenos, piogranulomas logo após a infecção, que coalescem dando origem a grandes áreas focais purulentas nos linfonodos drenantes (WILLIAMSON, 2001; MEYER et al., 2005; FONTAINE, et al. 2006). A bactéria então pode utilizar tanto a via linfática quanto a hemática para a dispersão, livre ou no interior dos fagócitos, atingindo outros órgãos como pulmão, fígado e rins, determinando assim a forma visceral grave da doença que pode variar entre diferentes linhagens da bactéria (BAIRD & FONTAINE et al., 2007; McKEAN et al., 2007; NIETO et al., 2009; JESSE et al., 2011). De certo, a utilização da via sanguínea por diferentes microrganismos para a disseminação acaba por envolver diretamente o baço podendo promover uma esplenomegalia (DUTTA et al., 2009; MATHURIN et al., 2009; DIAS et al., 2011; RODRIGUES-JUNIOR et al., 2012). No presente trabalho, novamente apenas as linhagens *Balb/c* e *Swiss* apresentaram granulomas em diversas localizações anatômicas, acometendo principalmente os linfonodos, enquanto que os animais *C57Black/6* não evidenciaram alterações durante os 120 dias de avaliação. Como também, foi possível relatar um comprometimento do baço (esplenomegalia) nos animais *Balb/c*, enquanto que o *C57Black/6* não demonstrou alteração nenhuma.

A avaliação do surgimento dos granulomas, bem como seus locais de acometimento, e o tamanho do baço nos animais *knockout* demonstram a importância do óxido nítrico no processo de destruição de microrganismos internalizados por células fagocíticas, e da citocina INF- $\gamma$  que atua ativando estas células, uma vez que estes animais demonstraram uma alta ocorrência e distribuição destes granulomas no início do processo infeccioso (07 e 14 dias) e um aumento significativo do tamanho do baço. A ausência de mecanismos relacionados com a contenção de microrganismos intracelulares promove uma maior dispersão destes pelo hospedeiro, comprometendo, desta forma, principalmente o baço e os linfonodos (PERRY et al., 1997; SIMMONS et al., 1997; BEAN, et al., 1999; WANG, et al., 1999; ALLIE et al., 2010; AMARAL et al., 2011; PACHECO, et al., 2012).

Por outro lado, ao serem avaliados os animais *knockout* para a citocina IL-10 não foi identificado nem mortalidade e nem alterações morfológicas, relacionadas ao surgimento de granulomas ou variações no peso do baço. Estes dados estão de acordo com a literatura, uma vez que, macrófagos dos animais *knockout* para a IL-10 produzem mais IL-12 (NARUSE et al., 2011), além de aumentar a produção de INF- $\gamma$ , correlacionado com o perfil Th1, como também consegue eliminar de forma mais eficiente microrganismos intracelulares, sem a necessidade da formação de granulomas (YANG et al., 1999; SHIBATA et al., 2001).

Nos pequenos ruminantes é observado que poucas horas após a infecção com *C. pseudotuberculosis* ocorre um influxo de neutrófilos para o local da infecção precedido pelos macrófagos e linfócitos. Após três dias, os neutrófilos não são mais encontrados ficando sobre a responsabilidade dos macrófagos e o envolvimento da resposta imune adaptativa, relacionados aos linfócitos, a tentativa de conter o microrganismo e promover então a formação dos granulomas em uma tentativa de diminuir a disseminação (PEPIN et al., 1992; PEPIN et al., 1994a; PEPIN et al., 1994b). O envolvimento da resposta imune celular, iniciando com a presença de neutrófilos e macrófagos e posteriormente com linfócitos foram caracterizados em modelo murino (JOLLY, 1965a; JOLLY, 1965b; LANN et al., 1999; LANN et al., 1998).

Desta maneira, a demonstração do direcionamento celular para o local da infecção, aqui caracterizado pela cavidade peritoneal, também foi visto no presente trabalho. Entretanto, observa-se características distintas entre as linhagens, uma vez que nos animais *Balb/c* rapidamente ocorre uma elevação na quantidade total das células (07º dia), seguido por uma queda com 30 dias e mais uma elevação com 60 dias que persiste até 120 dias; nos

animais *C57Black/6* a intensificação das células só é significativa a partir de 60 dias mantendo-se até 120 dias. Este fato pode estar relacionado com as características opostas do perfil da resposta imune, uma vez que os animais *C57Black/6* demonstram-se ser mais resistentes a esta bactéria, já que não foram observados óbitos e nem alterações morfológicas (formação de granulomas e esplenomegalia).

No entanto, ao se avaliar o diferencial celular, com a finalidade de caracterizar os tipos celulares mais abrangentes no percurso da infecção, os resultados aqui apresentados discordam em parte da literatura apresentada. Uma vez que mesmo sendo os neutrófilos e macrófagos as primeiras células que chegam ao local da infecção, os neutrófilos permanecem elevados na cavidade peritoneal após sete dias da infecção (ponto que corresponde ao maior influxo destas células) e mesmo apresentando uma variação nos demais pontos estudados estas células ainda podem ser encontradas em valores mais elevados que o grupo controle com 120 dias após a infecção nos animais *Balb/c*. Este dado pode estar relacionado a persistência deste microrganismo nesta região, já que esta linhagem de camundongo mostrou ser mais susceptível.

Nos animais *C57Black/6* os neutrófilos, mesmo tendo uma quantidade menor que nos animais *Balb/c*, ainda são identificados com sete dias e permanecem elevados aos 30º dia, e logo após voltando aos valores basais. Na avaliação dos macrófagos os valores não se modificam para os *C57Black/6*, entretanto nos animais *Balb/c* seguem o mesmo perfil dos neutrófilos, com aumento com sete dias e 120 dias. Já para os linfócitos é observada uma diminuição com 30 dias nos animais *Balb/c* e para os animais *C57Black/6* esta diminuição também é identificada aos 07 e 30 dias. A diminuição de linfócitos na cavidade peritoneal também foi identificada após infecção com *Trypanosoma cruzi*, esta diminuição estava relacionada a um direcionamento na produção de células plasmáticas ao invés das células B-1, que são encontradas principalmente na cavidade peritoneal (MINOPRIO et al., 1989; MERINO et al., 2010). Logo, a infecção estabelecida neste experimento também pode interferir, de forma diferenciada, nas linhagens de camundongos estudados, nas quais o intervalo da diminuição dos linfócitos na linhagem *C57Black/6* corresponde ao intervalo do aumento nos neutrófilos.

O que poderia justificar esta discrepância entre os resultados são as características peculiares do local da infecção, uma vez que a avaliação da dinâmica celular, disponível na literatura, está relatada com a infecção ocorrendo por via cutânea ou respiratória (PEPIN et

al., 1992; PEPIN et al., 1994a; PEPIN et al., 1994b). A cavidade peritoneal, local da infecção realizada neste estudo, possui um agrupamento celular residente distinto, que possivelmente interage e interfere diretamente em infecções iniciadas neste local. Ghosn (2008), utilizando a citometria de fluxo, descreve as células naturalmente residentes nas seguintes proporções: 30% são macrófagos, 55% de linfócitos da subpopulação B-1 e o restante são células NK, linfócitos T, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos. Ademais, Conlan & North (1994) relatam que a infecção por *Listeria monocytogenes* é exacerbada no fígado quando os neutrófilos são bloqueados por anticorpos RB6-8C5, fato este que não é visto nem no baço e nem na cavidade peritoneal, demonstrando assim que estas células podem ter importâncias diferentes a depender do local da infecção.

Já para nos animais *knockout* são observados um direcionamento elevado de células para o local da infecção nas linhagens KO-ON e KO-INF- $\gamma$ , que também apresentam um aumento exorbitante de neutrófilos no percurso da infecção. Este fato é similar ao encontrado na literatura durante a infecção de *M. tuberculosis* em animais *knockout* para TNF que revela um infiltrado neutrofilico intenso, além de uma desorganização local dos granulomas (BEAN, et al., 1999). No presente estudo, a avaliação histopatológica dos granulomas formados nestes animais não foi realizada, entretanto o aumento dos macrófagos e linfócitos nos animais C57Black/6-KO-INF- $\gamma$ , encontrados neste experimento, não foram capazes de conter o microrganismo levando ao surgimento de vários granulomas pelo corpo do animal. Mahon e colaboradores (1997) relatam que a ausência do INF- $\gamma$  interfere diretamente na disseminação de *Bordetella pertussis* pelo organismo do animal.

A fagocitose é o mecanismo de maior importância da imunidade natural contra microrganismos intracelulares, neste processo o óxido nítrico é uma das principais ferramentas, que é regulado pela citocina INF- $\gamma$  (NORTH, 1978; NORMAN et al., 2008). Entretanto, bactérias intracelulares patogênicas que são resistentes à degradação dentro dos fagócitos, tendem a causar infecções crônicas, difíceis de serem erradicadas, promovendo a morte destas células. Pacheco e colaboradores (2012) demonstraram que a ausência de óxido nítrico promove a morte *in vitro* de macrófagos infectados com *C. pseudotuberculosis*. Os dados aqui apresentados descrevem um aumento significativo no número de macrófagos apenas nos animais KO-INF- $\gamma$  que não é presente para os camundongos KO-ON, mesmo apresentando similaridades na quantidade total de células direcionadas para a cavidade e na quantidade específica de neutrófilos nestas duas linhagens de camundongo, demonstrando, desta forma, uma possível fragilidade destes macrófagos nos animais C57Black/6-KO-ON.

Era de se esperar que células aderentes da cavidade peritoneal dos animais *C57Black/6* selvagens, constituídas principalmente de macrófagos, células dendríticas e linfócitos B1, quando estimuladas em cultura com antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis*, apresentassem uma produção de citocinas pró-inflamatórias importantes para a eliminação de microrganismos intracelulares, uma vez que esta linhagem vem demonstrando uma resistência a esta bactéria. Desta forma, foi possível identificar a produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, INF- $\gamma$  e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).

O TNF- $\alpha$  e a citocina IL-1 $\alpha$  atuam aumentando a permeabilidade vascular promovendo um recrutamento de células da resposta imune, além de promover a ativação destas células. O INF- $\gamma$  também atua ativando principalmente os macrófagos induzindo a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos - MHC de classe I e II, sendo a sua produção estimulada principalmente pela IL-12 (NOLL et al., 1996; PERRY et al., 1997; ALLIE et al., 2009; BRANDÃO et al., 2011; DIAS et al., 2011). Outra citocina pró-inflamatória importante é a IL-6, principalmente por estimular a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e estimular a produção de neutrófilos (APPELBERG et al., 1994; LEAL et al., 1999; DIAS et al., 2011), como também a citocina IL-2, que além da sua ação em estimular a proliferação dos linfócitos, atua aumentando a ação citolítica das células NK (LEAL et al., 1999; CREVEL et al., 2002). A atuação destas citocinas, promovendo o recrutamento, ativação e aumentando a eficácia de células da resposta imune provavelmente tenham auxiliado na eliminação/controlar desta bactéria nos animais *C57Black/6*.

Além da produção destas citocinas pró-inflamatórias foi possível observar também o aumento da IL-10, citocina considerada do perfil Th3 que tem uma ação anti-inflamatória promovendo uma inibição da produção de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-12, além de diminuir a expressão de moléculas co-estimuladores e moléculas MHC da classe II nos macrófagos e células dendríticas, regulando a resposta imune (BOUSSIOTIS et al., 2000; DE LA BARRERA et al., 2004; PINHO et al., 2009). Desta forma, esta produção pode ser a responsável, *in vivo*, por não ser observado um aumento considerado na quantidade de células atraídas para a cavidade peritoneal durante a infecção nestes animais, entretanto as células que estavam presentes provavelmente puderam ser ativadas pelo grupo de citocinas pró-inflamatórias presentes atuando diretamente neste microrganismo.

A citocina IL-17 não foi produzida de forma detectável, e o Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF) não apresentou diferença entre as células

estimuladas apenas com meio e as que receberam antígenos secretados. A IL-17 poderia contribuir no controle de bactérias intracelulares por atuar no recrutamento de neutrófilos e de células T do perfil Th1 (KHADER et al., 2005; KHADER et al., 2007; UMEMURA et al., 2007; BAI et al, 2009). O GM-CSF, além de promover a maturação de células da medula óssea para aumentar a produção de leucócitos, pode atuar na ativação de neutrófilos e macrófagos (ZHAN, et al., 1998; TANTAWICHIEEN, 1996).

Embora a estimulação pelos antígenos secretados da bactéria tenha promovido a produção de varias citocinas pró-inflamatórias e da IL-10, *in vitro*, ao se avaliar a produção destas mesmas citocinas em cultura na presença da bactéria viável (na proporção de 1:5), nos animais *C57Black/6* selvagem e *knockout*, não foram observados os mesmos resultados. Apenas ocorreu uma produção estatisticamente significativa para as citocinas TNF- $\alpha$  nos animais selvagens e KO-INF $\gamma$ , e da citocina GM-CSF para KO-IL-10. O intuito deste ensaio estava relacionado com a avaliação da capacidade que antígenos presentes na parede bacteriana teriam em estimular ou inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, os resultados aqui apresentados, referidos a não produção destas citocinas, poderiam estar correlacionados com a quantidade de bactérias co-cultivada, entretanto experimentos utilizando macrófagos de animais *CBA* estimulados com tioglicolato e cultivados com a mesma proporção apresentaram produções de INF- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 em níveis detectáveis (Silva e colaboradores, dados não publicados). Ademais, já foi demonstrado na literatura que antígenos somáticos de *C. pseudotuberculosis* podem estar contribuindo para uma diminuição da resposta imune, principalmente por diminuir a produção de INF- $\gamma$  e estimular a citocina IL-10 (REGIS, 2001; MEYER et al., 2005; SILVA, 2010). A elevação na citocina TNF- $\alpha$  poderia estar relacionada com a secreção por parte destas bactérias de antígenos solúveis, e como esta citocina é uma das primeiras a serem produzidas necessitariam de quantidades menores de proteínas secretadas pelas bactérias.

A avaliação da fagocitose e/ou invasão pela bactéria foi avaliada por meio da visualização deste microrganismo dentro das células, uma vez que foi relatado que, além da realização da fagocitose por células fagocíticas, a *C. pseudotuberculosis* pode aderir e invadir células não fagocíticas, e desta forma, atuar na manutenção deste microrganismo no hospedeiro (VALDIVIA et al., 2012).

A resposta imune esperada contra patógenos intracelulares facultativos envolvem as células T CD4<sup>+</sup>, da subpopulação Th1, com produção principalmente de INF- $\gamma$  e ativação de

células fagocíticas; enquanto que linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão envolvidos tanto na produção de mais INF- $\gamma$ , como também na identificação e eliminação de células infectadas (ZHAN & CHEERS, 1993; LAN et al., 1998; MURPHY et al., 2001; MACHADO et al., 2004; MATHURIN et al., 2009; BRANDÃO et al., 2012). Neste sentido, a avaliação da proporção de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, através da imunofenotipagem, como também a definição do grupo de citocinas produzidas no momento da eutanásia, e assim definir a ou as subpopulações encontradas, torna-se um valioso instrumento.

Para tanto, foi identificada uma diminuição na intensidade de fluorescência das células T CD4<sup>+</sup> nos animais *Balb/c*; ao passo que foi observado uma constância, e de maneira geral, valores mais elevados na linhagem *C57Black/6*; enquanto que nos animais *Swiss* os valores estão baixos sendo relatado um aumento apenas com 60 e 120 dias da infecção. Enquanto que para as células T CD8<sup>+</sup> foi encontrado nos animais *Swiss* um aumento destas células, também, com 60 e 120 dias.

Esta diminuição das células T CD4<sup>+</sup> pode estar relacionada com uma maior susceptibilidade e cronicidade da infecção com *C. pseudotuberculosis* nos animais *Balb/c*, uma vez que é relatado na literatura, em estudos com a *Brucella abortus*, o envolvimento de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> - células regulatórias - agindo diretamente limitando a eficácia de células T CD4<sup>+</sup>, levando, com isso, a uma diminuição da produção de INF- $\gamma$  nos animais *Balb/c*, que também é considerada susceptível a infecção por *B. abortus*, favorecendo a manutenção e progressão da infecção por esta bactéria (PASQUALI et al., 2010). Ademais, foi relatado que a *Yersinia pseudotuberculosis*, pode reduzir a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos – MHC, de classe II, além de moléculas co-estimulatórias, de células dendríticas principalmente dos animais *Balb/c* em comparação com *C57Black/6* (TANSINI et al., 2012), fato este que pode interferir no processo de ativação e proliferação de linfócitos T, e desta forma, contribuir para uma diminuição celular.

Já o aumento da intensidade de fluorescência de CD8<sup>+</sup> visto nos animais *C57Black/6* selvagem, que vem demonstrando ser mais resistentes a este microrganismo, pode demonstrar a importância desta célula no controle de infecções com bactérias intracelulares através da produção de citocina INF- $\gamma$  como também identificando e eliminando células infectadas, como é observado em camundongos infectados com *B. abortus* (ARAYA et al., 1989; OLIVEIRA & SPLITTER, 1995).

Para os animais *knockout* era esperada uma elevação destas células principalmente nos animais *C57Black/6-KO-IL-10*, uma vez que animais *knockout* para esta citocina, quando infectados com *Chlamydia trachomatis* apresentaram maiores produções de células T CD4<sup>+</sup> (YANG et al, 1999), fato este não observado no presente trabalho, este resultado poderia estar relacionado a uma eficiente eliminação do microrganismo devido a uma maior aptidão das células fagocíticas em eliminar este patógeno (SHIBATA et al., 2001; NARUSE et al, 2011).

De certo, as avaliações da produção de citocinas são importantes na caracterização de uma resposta imune frente a um patógeno. Sendo assim, a estimativa da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , foram mensuradas no sobrenadante do homogenato do baço. O principal objetivo foi identificar quais eram as citocinas produzidas localmente (baço) e/ou de forma sistêmica no momento da eutanásia dos animais durante o percurso da infecção. Este procedimento já foi descrito, demonstrando variações estatisticamente significativas, para a avaliação de citocinas do homogenato de baço (AUJLA et al., 2008; NEWSOM et al., 2011; GOEL & BHANAGAR, 2012; JIM et al., 2012; ZHU et al., 2012); cérebro (DATTA & OPP, 2008; TRIBOUILLARD-TANVIER et al., 2009; NEWSOM et al., 2011); linfonodo mesenquimal (NEWSOM et al., 2011) ou de pulmão (CAMPBELL et al., 2006).

Estas citocinas foram divididas em grupos, relacionadas com as principais funções. Para as citocinas pró-inflamatórias, constituídas pelas citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17, foi identificado um aumento gradual da citocina IL-1 $\alpha$ , iniciando aos 30 dias, nos animais *Balb/c*, enquanto que para os animais *C57Black/6* é encontrado um aumento a partir do primeiro ponto analisado, que corresponde ao sétimo dia, enquanto que a citocina TNF- $\alpha$ , nos animais *Swiss*, apresenta uma diferença estatística com uma diminuição da produção, enquanto que nos camundongos *C57Black/6*, que não apresentam diferença estatística, a produção não se altera. A presença de IL-1 $\alpha$  nos animais *Balb/c* podem estar contribuindo com a formação dos granulomas identificados nesta linhagem, uma vez que foi descrito na literatura que esta citocina poderia promover a indução da proliferação de fibroblastos, estimulando a deposição de colágeno, importantes na formação dos granulomas (LONNEMANN et al., 1995).

Para o grupo de citocinas relacionadas ao perfil Th3 (IL-10 e IL-13) e perfil Th2 (IL-4 e IL-5), é observada uma diminuição da produção de IL-10 nos animais *Swiss* com 60 dias pós-infecção, entretanto esta diminuição não estava acompanhada de um aumento na produção de

citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-6, como descrito por Frediani (2009) ao comparar animais *Balb/c* selvagens com animais deficientes em linfócitos B-1 após estímulo com LPS. Ademais, o aumento da produção de IL-10 desencadeia uma inibição da apoptose em macrófagos contendo *Mycobacterium tuberculosis* que, por sua vez, auxilia na dispersão e comprometimento do animal (RODRIGUES et al., 2009), mesmo apresentando esta diminuição da produção da IL-10, esta linhagem, *Swiss*, apresentou a maior quantidade de granulomas observados (05/17). Para a citocina IL-13, os animais *C57Black/6* selvagens, do segundo experimento, mostraram uma diminuição no sétimo dia e um retorno aos valores basais no 14º dia. Esta citocina está diretamente relacionada com a resposta da subpopulação Th2, principalmente envolvida com resposta para helmintos (WYNN, 2003; PRICE et al., 2010), entretanto o perfil Th2 pode contribuir para a formação/maturação de granulomas, que são importantes no controle de microrganismos intracelulares, através do estímulo para a produção de fibrinogênio e fatores de crescimento de tecido conectivo (MURRAY et al., 2006; REIMAN et al., 2006; McFARLANE et al., 2011; LIU et al., 2012). Estudos recentes vêm demonstrando uma relação entre esta citocina e o estabelecimento de granulomas, além de contribuir para a eliminação de microrganismos intracelulares como a *Leishmania donovani* (MURRAY et al., 2006; McFARLANE et al., 2011). Já a elevação da citocina IL-5 nos pontos 07 e 60 dias, foi identificada nos animais *C57Black/6*, este aumento poderia estar relacionado com a formação de granulomas, uma vez que esta citocina é importante no processo de fibrose (REIMAN et al., 2006), entretanto nesta linhagem não foi observado a formação de granuloma, logo a produção da IL-5 poderia indicar uma resposta mista com IL-5 relacionado com o perfil Th2 e uma maior atividade das células fagocíticas relacionados ao perfil Th1.

Nos animais *C57Black/6* também foi identificado um aumento da produção de IL-27 com 120 dias, ao passo que foi observado uma diminuição com 07 e 30 e 60 dias de forma gradual para os animais *Swiss*. Esta citocina está relacionada com um aumento da proliferação e diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> da subpopulação Th1, principalmente por agir de forma sinérgica a IL-12 e estimular a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> (WOLK et al., 2002; LUCAS et al., 2003; KAWAKAMI et al., 2004; VILLARINO et al., 2006; GROOT et al., 2012). Somando-se ao aumento desta citocina na linhagem *C57Black/6* foi identificado o aumento, também, da citocina IL-22, no segundo experimento (animais *C57Black/6* selvagens e *knockout*). A IL-22 é responsável em inibir a produção de IL-4 (WOLK et al., 2002). Este contexto sugere que nos animais *C57Black/6* selvagens ocorre a produção de um grupo de

citocinas que atuam na indução de um perfil Th1, que por sua vez, pode contribuir para a maior resistência desta linhagem a infecções com *C. pseudotuberculosis*.

Nos animais *knockout* para INF- $\gamma$  foi identificado um aumento da citocina IL-1 $\alpha$  e uma diminuição gradual da citocina IL-21. A elevação da IL-1 $\alpha$  pode estar correlacionada com uma tentativa de atrair e ativar mais células, uma vez que estas células presentes no sítio da infecção demonstram uma dificuldade em eliminar os microrganismos, uma vez que estes animais não produzem INF- $\gamma$ . O INF- $\gamma$  é a principal citocina produzida pelas células do perfil Th1, sendo assim a diminuição da produção de IL-21 era esperada, uma vez que, esta citocina tem como finalidade 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 CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> o que parece aumentar a resposta auxiliar Th1 e a atividade de linfócitos T citotóxicos (LEONARD et al., 2005; LI et al., 2005; ZENG et al., 2005; LÜTHJE et al., 2011).

Entretanto, muitas citocinas aqui analisadas apresentaram valores muito baixos, não sendo possível caracterizar a dinâmica das produções durante a infecção com estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, na verdade, a avaliação utilizando outro protocolo, como por exemplo, a mensuração em sobrenadante de cultura, deve ser apreciada para melhor compreender/relacionar o papel destas citocinas no percurso da infecção, uma vez que foi quantificado valores mais expressivos na cultura com antígenos secretados da bactéria do que no homogenato do baço em algumas delas. Como também já foi relatado diferenças na produção das citocinas IL-4, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  após estímulo em cultura de animais infecção com *C. pseudotuberculosis* (SOUZA, 2009; SILVA, 2010).

Desta maneira, as avaliações dos resultados aqui apresentados propõem uma discrepância entre as linhagens *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss* no tipo de resposta imune estabelecida durante infecção com *C. pseudotuberculosis*. Esta diferença entre linhagens de camundongos também pode ser relatada para: *Brucella abortus* (MURPHY et al., 2001), *Yersinia enterocolitica* (AUTENRIETH et al, 1994); *Yersinia pseudotuberculosis* (TANSINI & MEDEIROS, 2009); *M. bovis* (WERNECK-BARROSO et al., 2000), nestes estudos foi possível identificar que animais *C57Black/6* são mais resistentes do que os animais da linhagem *Balb/c*. Os dados aqui apresentados também descrevem a linhagem *C57Black/6* como animais mais resistentes a infecção com 10<sup>7</sup> de T1, uma vez que estes animais não apresentaram mortalidade durante 120 dias de estudo, não apresentaram alterações

morfológicas, apresentaram um direcionamento celular para o local da infecção, como também a produção de citocinas por células fagocíticas compatíveis com uma atuação bem sucedida frente a infecções por microrganismos intracelulares. Por outro lado, os animais *Balb/c* demonstraram-se ser mais susceptíveis a infecção principalmente por apresentarem mortalidade e alterações morfológicas semelhantes às observadas nos pequenos ruminantes naturalmente infectados.

Esta desigualdade entre as linhagens provavelmente está relacionada com a diferença no *Locus* do MHC (Complexo principal de histocompatibilidade), onde os animais *Balb/c* possuem o *locus* H-2d e os *C57Black/6* o H-2b. O polimorfismo comum destas moléculas está relacionado com uma melhor capacidade de reconhecer moléculas diferentes pelo sistema imune em um organismo, entretanto ao se estabelecer linhagens isogênicas cria-se uma uniformidade genética entre os grupos de animais desencadeando respostas imunes distintas entre diferentes linhagens (SOUSA et al., 2000; WERNECK-BARROSO et al., 2000; MESSAOUDI et al., 2002; PENN et al., 2002). No entanto, os animais *Swiss*, que são heterogênicos, mesmo apresentando alguns resultados que os aproxima dos animais *Balb/c* - apresentando uma susceptibilidade para esta bactéria – evidenciaram uma disparidade entre parâmetros analisados no mesmo grupo, e por este motivo não apresentaram, em algumas análises, diferenças estatisticamente significativas. Esta dificuldade também é encontrada ao avaliar as respostas imunes desenvolvidas nos pequenos ruminantes. Uma possibilidade seria trabalhar com grupos maiores nesta linhagem.

A geração de camundongos *knockout*, através da deleção de um gene de interesse, cada vez mais vem sendo aplicado com a finalidade de implementar a compreensão a respeito do envolvimento de determinados elementos da resposta imune frente a diversas infecções. Neste sentido, o presente trabalho demonstrou a importância/envolvimento do óxido nítrico, INF- $\gamma$  e da citocina IL-10 para a eliminação ou estabelecimento da infecção da bactéria T1, já que os animais KO para a citocina IL-10 demonstraram-se ser mais resistentes, não apresentando nem mortalidade, nem alterações morfológicas e o perfil tanto da resposta imune inata quanto adaptativa estavam relacionados com uma resistência a este cocobacilo. Enquanto que os animais KO para ON e para INF- $\gamma$  demonstraram-se ser mais sensíveis do que os animais selvagens, apresentando mortalidade e alterações morfológicas de forma muito acentuada.

Sendo assim, o presente estudo contribuiu para a compreensão da relação *parasito-hospedeiro*, frente à diferentes linhagens de camundongos com uma estirpe atenuada de *C. pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos. Este trabalho descreve aspectos relacionados com a resposta imune em animais susceptíveis e resistentes, que por sua vez, poderão contribuir em avaliações de protocolos de imunização/desafio visando o desenvolvimento de vacinas ou imunoterapias.

### **Agradecimentos**

Este estudo teve apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), da Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAPEX) e do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Tabela 01 Quantidade (positivo/avaliado) de animais *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*, com presença de granulomas por grupo analisado.

Tempo	Balb/c Cont.	Balb/c T1	C57black/6 Cont.	C57black/6 T1	Swiss Cont.	Swiss T1
07 dias	00/02	00/05	00/02	00/05	00/02	00/05
30 dias	00/02	02/05	00/02	00/05	00/02	03/05
60 dias	00/02	00/05	00/02	00/05	00/02	01/05
120 dias	00/02	01/03	00/02	00/05	00/02	01/02
Total	00/08	03/18	00/08	00/20	00/08	05/17

Tabela 02. Principais regiões anatômicas acometidas com granulomas nos animais *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*.

Região Anatômica	Balb/c Cont.	Balb/c T1	C57black/6 Cont.	C57black/6 T1	Swiss Cont.	Swiss T1
Linfonodo	00	03	00	00	00	03
Fígado	00	00	00	00	00	01
Cutâneo	00	00	00	00	00	02
Total	00	03	00	00	00	06

Tabela 03 Quantidade (positivo/avaliado) de animais *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$* , *C57Black/6-KO-IL-10* com presença de granulomas por grupo analisado.

Tempo	Selv. Cont.	Selv. T1	Ko-ON Cont.	Ko-ON T1	Ko-IFN Cont.	Ko-IFN T1	Ko-IL-10 Cont.	Ko-IL-10 T1
07 dias	00/02	00/05	00/02	04/05	00/02	00/05	00/02	00/05
14 dias	00/02	00/05	00/02	01/01	00/02	05/05	00/02	00/05
Total	00/04	00/10	00/04	05/06	00/04	05/10	00/04	00/010

Tabela 04. Principais Regiões Anatômicas acometidas com granulomas nos animais *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$* , *C57Black/6-KO-IL-10*.

Região Anatôm.	Selv. Cont.	Selv. T1	Ko-ON Cont.	Ko-ON T1	Ko-IFN Cont.	Ko-IFN T1	Ko-IL-10 Cont.	Ko-IL-10 T1
Linfonodo	00	00	00	06	00	14	00	00
Cav. Perit.	00	00	00	03	00	00	00	00
Fígado	00	00	00	01	00	01	00	00
Rim	00	00	00	00	00	02	00	00
Diafragma	00	00	00	01	00	00	00	00
Cutâneo	00	00	00	00	00	03	00	00
Pulmão	00	00	00	00	00	01	00	00
Total	00	00	00	11	00	21	00	00

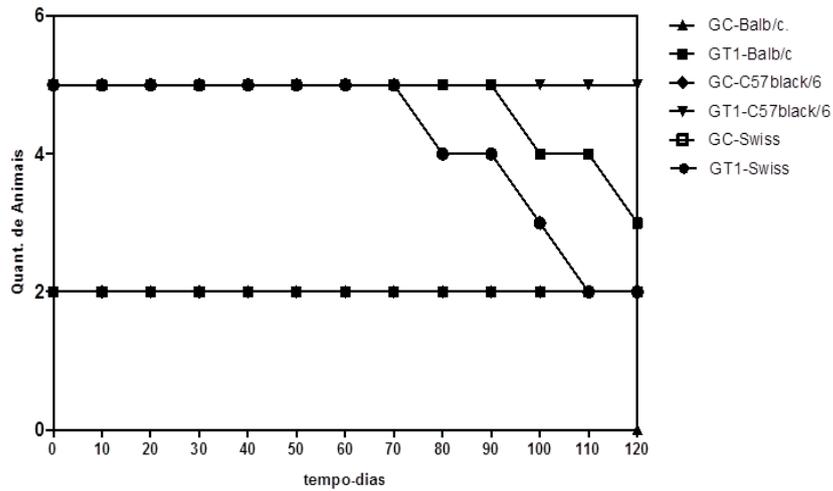


Figura 01 - Determinação da curva de mortalidade de camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Foram avaliados, por linhagem, cinco animais infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis* e dois animais do grupo controle (GC). Os animais foram avaliados diariamente durante 120 dias após a infecção e os óbitos foram registrados.

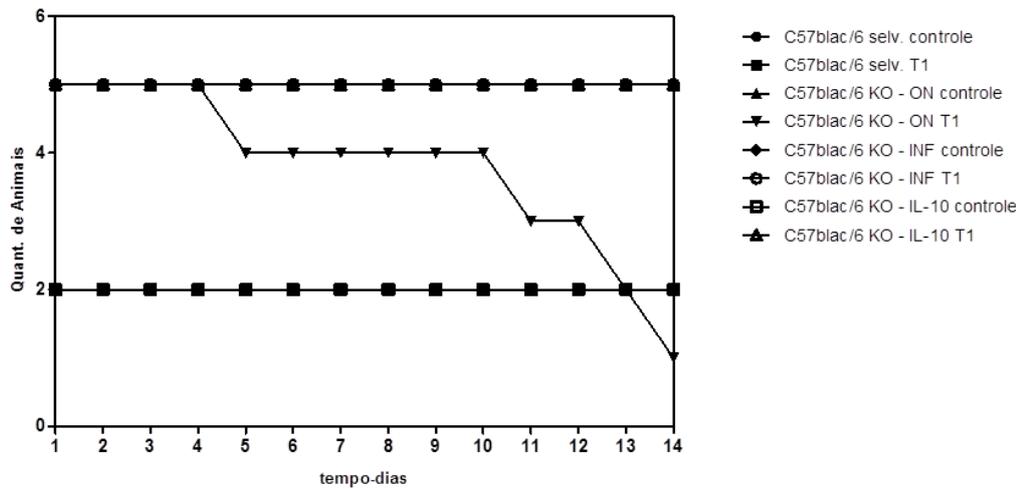


Figura 02 - Determinação da curva de mortalidade de camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*. Foram avaliados, por linhagem, cinco animais infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis* e dois animais do grupo controle. Os animais foram avaliados diariamente durante 14 dias após a infecção e os óbitos foram registrados.

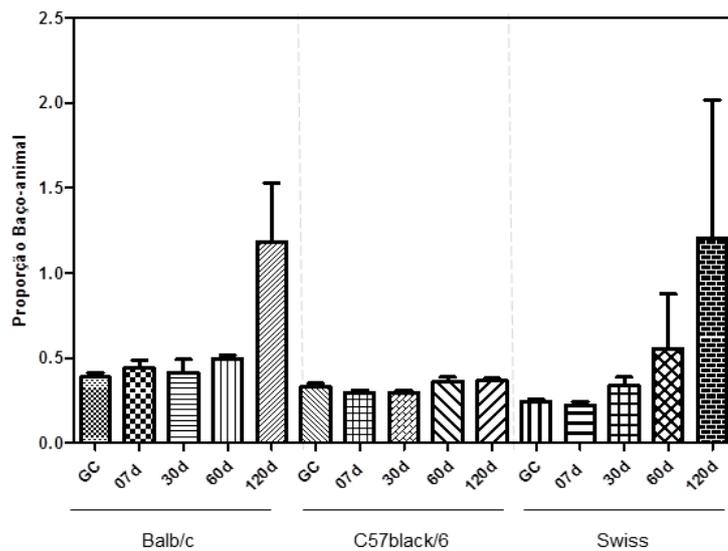


Figura 03 – Determinação do peso do Baço de camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde o peso corporal, seguido pelo do baço, foram obtidos. A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, ( $p = 0,0209$ ) apenas no grupo *Balb/c*, que possui a seguinte relação: 120 d = 60 d > GC = 07 d = 30 d. Os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

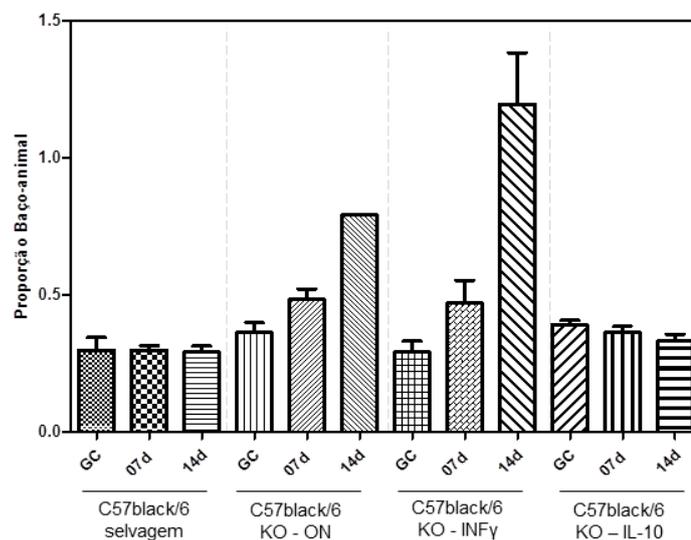


Figura 04 – Determinação do peso do Baço de camundongos *C57Black/6*selvagem, *C57Black/6*-KO-ON, *C57Black/6*-KO-INF $\gamma$  e *C57Black/6*-KO-IL-10. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde o peso corporal, seguido pelo do baço, foram obtidos. A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, e apenas os animais *C57Black/6*-KO-INF $\gamma$  apresentaram diferença estatística significativa ( $p = 0,0066$ ), revelando a seguinte relação: 14 d > GC.

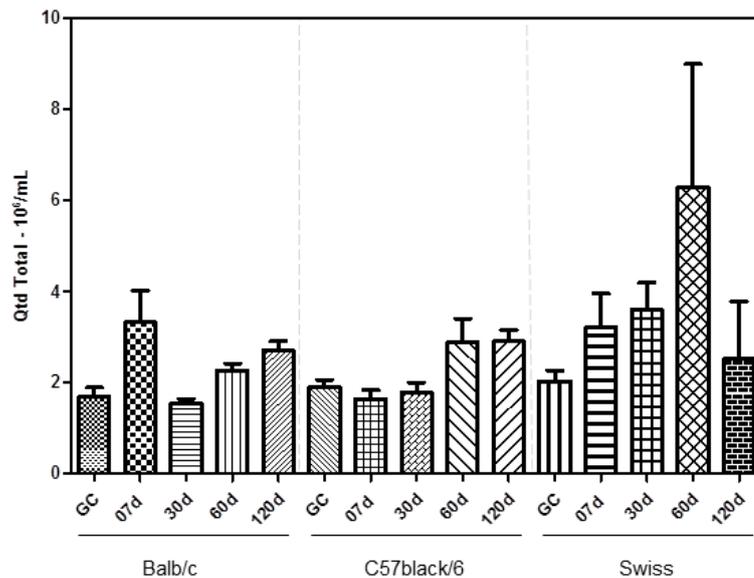


Figura 05 – Determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde foi realizada a quantificação total de células presentes na cavidade peritoneal através de um contador automático de células. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa nos animais *Balb/c*, ( $p = 0,0084$ ), com a seguinte relação: 07 d > GC = 30 d; 30 d < 60 d = 120 d. Para os animais *C57Black/6* ( $p = 0,0228$ ), e a seguinte relação: 120 d > GC = 07 d = 30 d. Não foi identificada diferença estatística significativa para os animais do grupo *Swiss*.

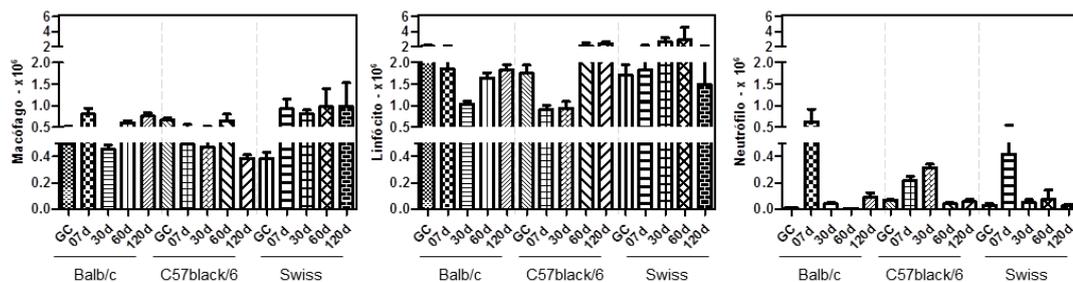


Figura 06 – Determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde foi realizada a avaliação através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes valores para a linhagem *Balb/c*: *Macrófagos* ( $p = 0,0087$ ), tendo como relação – 07 d = 120 d > GC = 30 d; *Linfócitos* ( $p = 0,0288$ ), apresentando – GC = 07 d = 120 d = 60 d > 30 d e *Neutrófilos* ( $p = 0,0006$ ), apresentando a seguinte relação: 07 d > GC, 30 d, 60 d, 120 d e 120 d > GC = 60 d; 30 d > 60 d. Para os animais da linhagem *C57Black/6*, os *Linfócitos* ( $p = 0,0015$ ), e relação: GC = 60 d = 120 d > 07 d = 30 d e os *Neutrófilos* ( $p = 0,0005$ ), e a seguinte relação: 07 d = 30 d > GC = 60 d = 120 d. Os animais *Swiss* não apresentaram diferença estatística significativa.

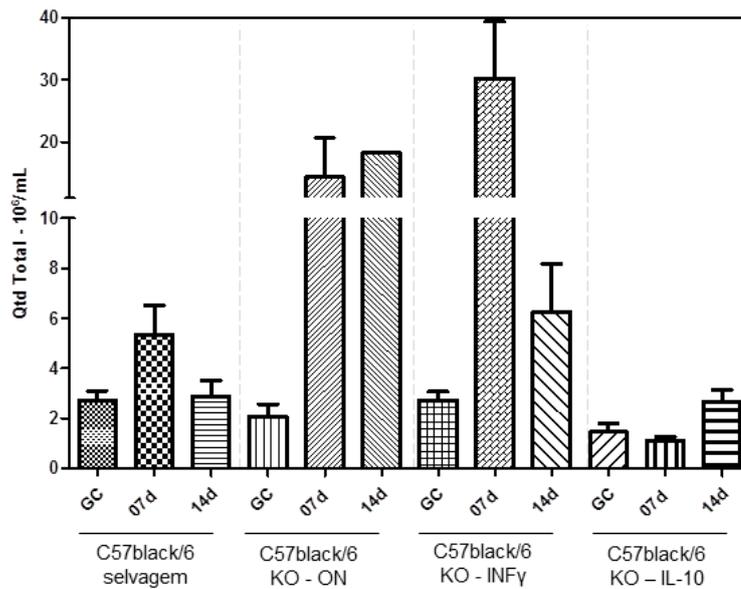


Figura 07 – Determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6*-KO-ON, *C57Black/6*-KO-INF- $\gamma$  e *C57Black/6*-KO-IL-10. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde foi realizada a quantificação total de células presentes na cavidade peritoneal através de um contador automático de células. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde os animais *C57Black/6*-OK-ON ( $p = 0,0327$ ) e relação: 07 d > GC. Para os animais *C57Black/6*-OK-INF- $\gamma$  ( $p = 0,0059$ ) e relação: 07 d > 14 d > GC. Para os camundongos *C57Black/6*-OK-IL-10 ( $p = 0,0444$ ), tendo 14 d > 07 d.

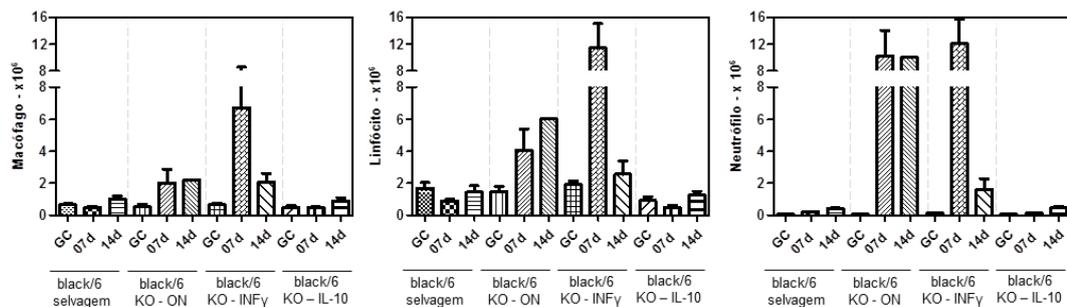


Figura 08 – Determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6*-KO-ON, *C57Black/6*-KO-INF- $\gamma$  e *C57Black/6*-KO-IL-10. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde foi realizada a avaliação através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes achados: ***C57Black/6* selvagem** com *neutrófilos* ( $p = 0,0031$ ), onde 14 d > 07 d > GC; o grupo ***C57Black/6*-OK-ON** com os *neutrófilos* ( $p = 0,0266$ ) com 07 d > GC; os ***C57Black/6*-OK-INF $\gamma$**  para os *macrófagos* ( $p = 0,0052$ ), sendo: 07 d > 14 d > GC, *linfócitos* ( $p = 0,0110$ ), onde 07 d > 14 d = GC, e os *neutrófilos* ( $p = 0,0031$ ), onde: 07 d > 14 d > GC; para o grupo ***C57Black/6*-OK-IL-10** os *neutrófilos* ( $p = 0,0039$ ), tendo: 14 d > 07 d > GC.

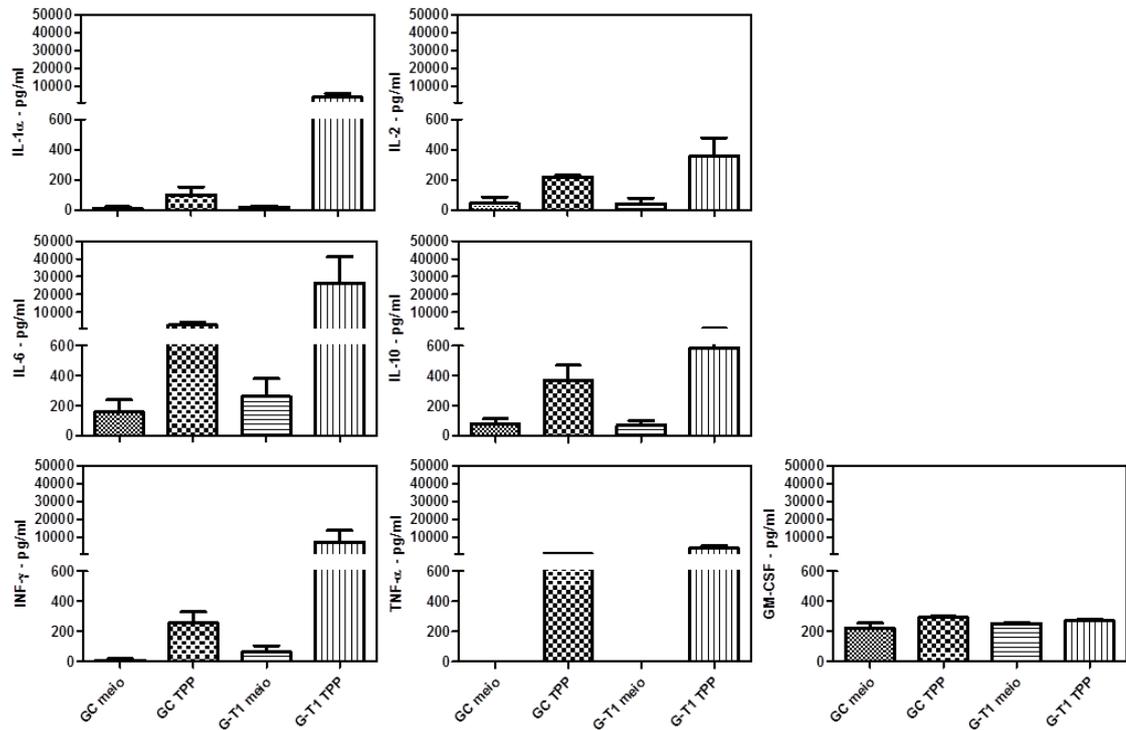


Figura 09 – Determinação da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 por células aderentes dos animais *C57Black/6* estimuladas com antígeno secretado da bactéria T1 (TPP). Os camundongos *C57Black/6* foram injetados com salina (grupo controle) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis* (grupo teste), por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 14 dias, onde as células peritoneais, tanto do grupo controle (GC), quanto do grupo teste (G-T1) foram cultivadas na presença de apenas meio RPMI ou de  $40\mu\text{g/mL}$  de TPP durante 24h. A quantificação foi realizada no sobrenadante de cultura utilizando citometria de fluxo. É possível observar uma diferença estatística, através do teste de Kruskal-Wallis, na produção das seguintes citocinas: **IL-1 $\alpha$**  ( $p = 0,0050$ ), e o pós-teste realizado pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney, entre as células que receberam apenas meio com as que foram estimuladas com os antígenos da T1, no grupo teste possui  $p = 0,0119$ ; **IL-2** ( $p = 0,0048$ ), onde no pós-teste o grupo controle apresentou um  $p = 0,0265$ , e o grupo teste um  $p = 0,0178$ ; **IL-6** ( $p = 0,0271$ ) com pós-teste para o grupo teste com  $p = 0,0119$ ; **IL-10** ( $p = 0,0041$ ) onde o grupo controle possui um  $p = 0,0286$  e no grupo teste,  $p = 0,0119$ ; **INF- $\gamma$**  ( $p = 0,0267$ ) e pós-teste para o grupo teste com  $p = 0,0459$  e a citocina **TNF- $\alpha$**  ( $p = 0,0133$ ) apresentando no pós-teste para o grupo teste um  $p = 0,0097$ . Não foi observada a produção da citocina **IL-17** e nem uma diferença estatística significativa para as células estimuladas com os antígenos para a **GM-CSF**.

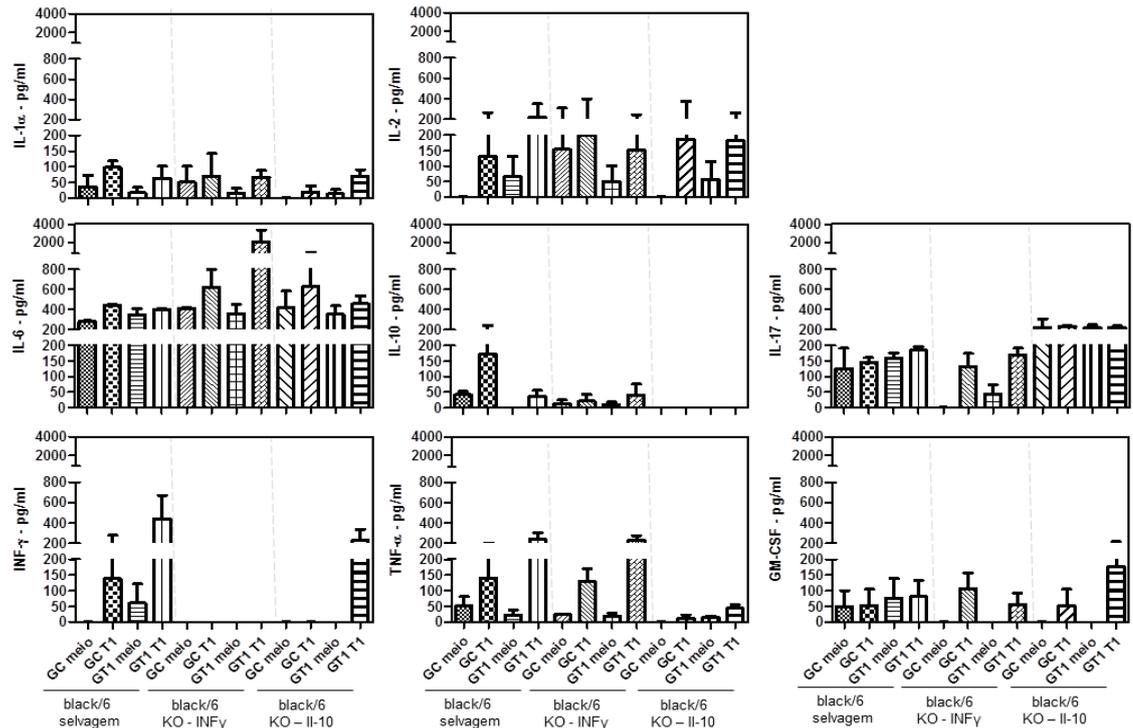


Figura 10 – Determinação da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF-  $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 por células aderentes dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO- $\text{INF-}\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10* estimuladas com *C. pseudotuberculosis* viva. Os camundongos *C57Black/6* foram injetados com salina (grupo controle) ou infectados com  $10^7/\text{ml}$  da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis* (grupo teste), por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 14 dias, onde as células peritoneais, tanto do grupo controle (GC), quanto do grupo teste (GT1) foram cultivadas na presença de apenas meio RPMI ou de *C. pseudotuberculosis* viva (T1), na proporção de (1:5), por 01h30 min. A quantificação foi realizada no sobrenadante de cultura utilizando citometria de fluxo. É possível observar uma diferença estatística, através do teste de Kruskal-Wallis, na produção das seguintes citocinas: **TNF- $\alpha$**  para os animais *C57black/6 selvagem* ( $p = 0,0347$ ) e pós-teste no grupo teste com  $p = 0,0294$ , para o grupo *C57black/6-KO- $\text{INF-}\gamma$*  ( $p = 0,0168$ ) com pós-teste no grupo teste de  $p = 0,0119$  e a produção da citocina **GM-CSF** para os animais *C57black/6-KO-IL-10* ( $p = 0,02680$ ) no grupo teste, com  $p = 0,097$ . Não foi observada uma diferença estatística significativa ao se analisar as citocinas: **IL-1 $\alpha$** , **INF- $\gamma$** , **IL-10**, **IL-6**, **IL-2** e **IL-17**.



Figura 11 – Célula aderente de camundongo *C57Black/6* selvagem infectada com *C. pseudotuberculosis* viva. Os camundongos *C57Black/6* foram injetados com salina (grupo controle) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis* (grupo teste), por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 14 dias, onde as células peritoneais, tanto do grupo controle (GC), quanto do grupo teste (GT1) foram cultivadas na presença de apenas meio RPMI ou de *C. pseudotuberculosis* viva (T1), na proporção de (1:5), por 01h30 min. A seta indica presença da bactéria internalizada.

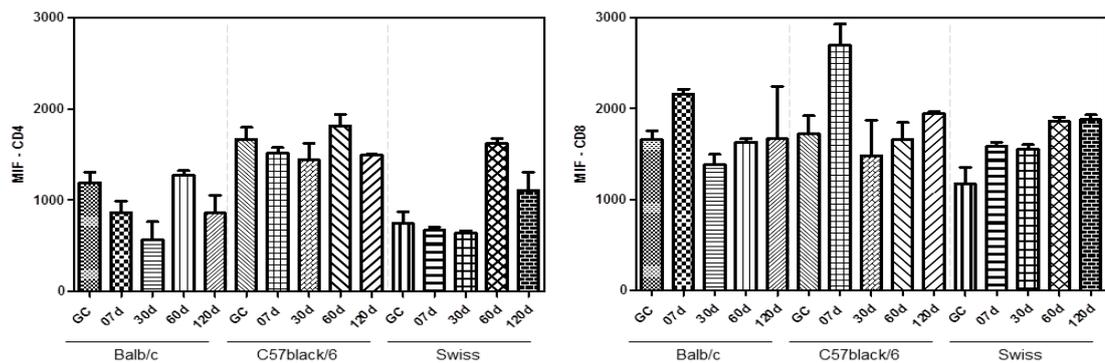


Figura 12 – Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes valores para o MIF de  $CD4^+$ , os animais *Balb/c* ( $p = 0,0393$ ), com a seguinte relação: GC = 60 d = 120 d > 07 d = 30 d. Os animais *Swiss* ( $p = 0,0056$ ), e relação: 60 d > GC = 07 d = 30 d = 120 d. Os animais *C57Black/6* não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Para o MIF de  $CD8^+$  foi identificado diferença estatisticamente significativa apenas para os animais *Swiss* ( $p = 0,0070$ ), onde 60 d > GC = 07 d = 30 d.

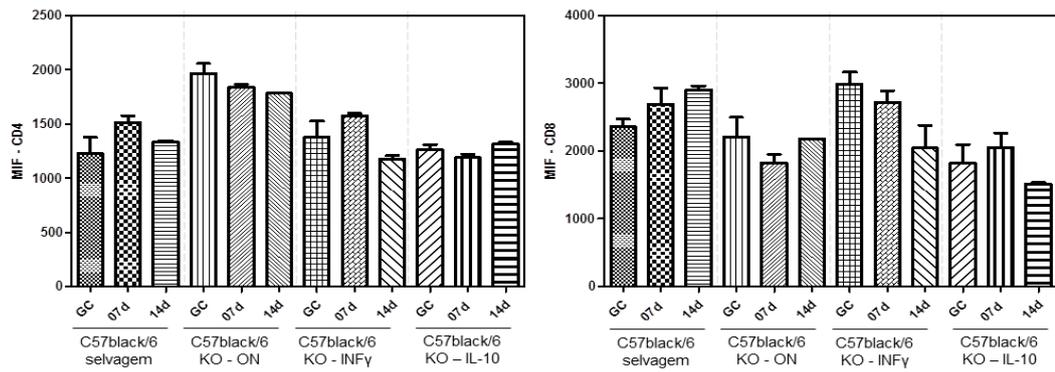


Figura 13 – Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com 10<sup>7</sup>/ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes valores para o MIF de CD4<sup>+</sup>, apenas no grupo ***C57Black/6 selvagem*** ( $p = 0,0159$ ) tendo como relação 07d > 14 d = GC. O MIF para CD8<sup>+</sup> não apresentou diferença estatística significativa em nenhum grupo avaliado.

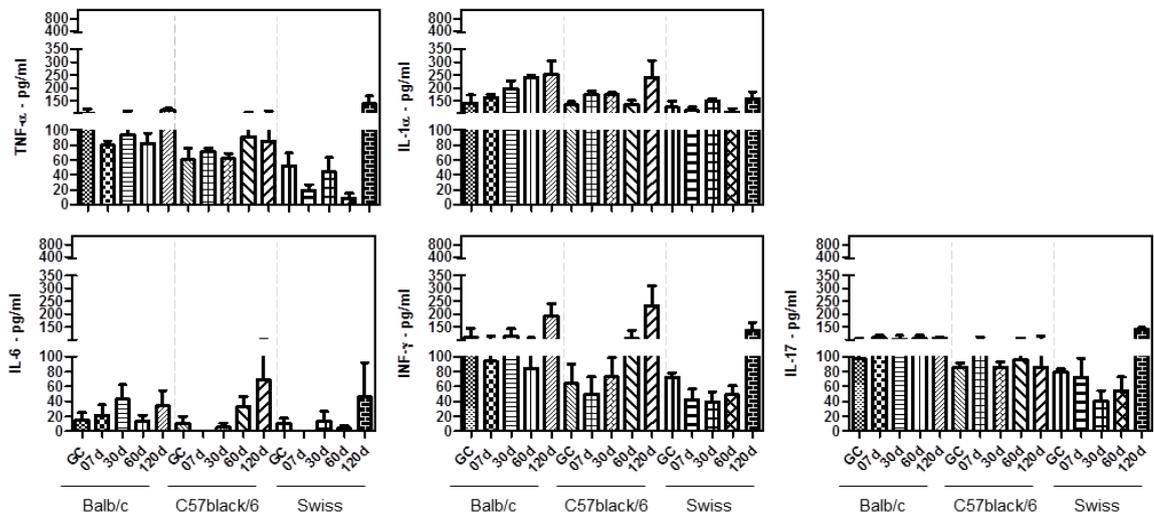


Figura 14 – Determinação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com 10<sup>7</sup>/ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas para a citocina **TNF- $\alpha$**  do grupo *Swiss* ( $p = 0,0339$ ), com 60 d < GC e da **IL-1 $\alpha$**  para os animais *Balb/c* ( $p = 0,0177$ ), revelando: GC = 07 d < 60 d, e para *C57Black/6* ( $p = 0,0355$ ), mostrando que 07 d = 30 d > GC. Não foi possível detectar diferenças estatísticas significativas para **IL-6**, **INF- $\gamma$**  e **IL-17**.

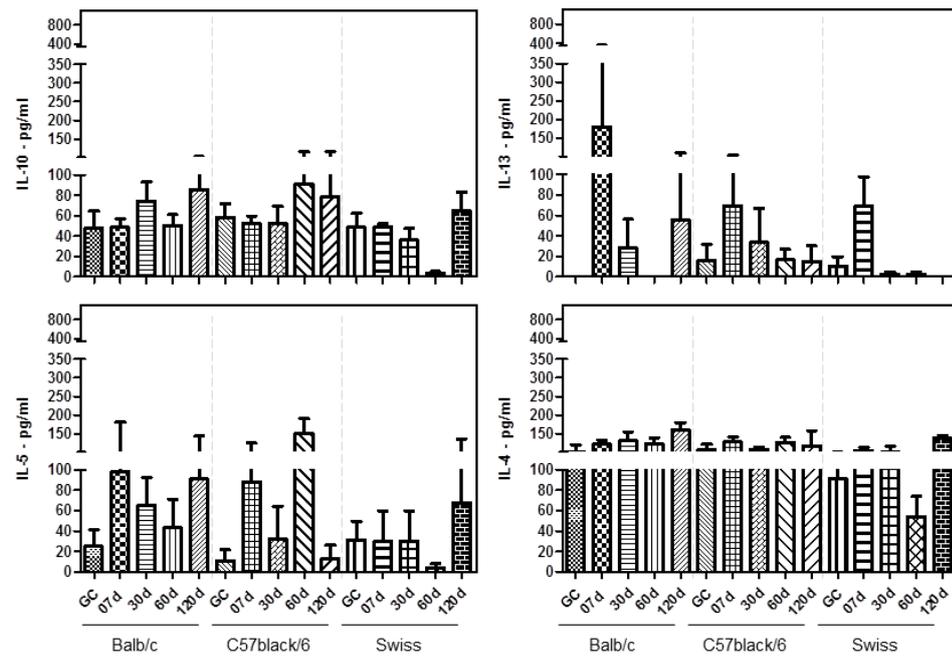


Figura 15 – Determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas para a citocina **IL-10**, no grupo *Swiss* ( $p = 0,0443$ ), apresentando: 60 d < GC = 07 d e a da citocina **IL-5** para os animais *C57Black/6* ( $p = 0,0361$ ) revelando a seguinte relação: 60 d > GC = 30 d = 120 d. Não foi detectada diferença estatística significativa para as citocinas **IL-13** e **IL-4**.

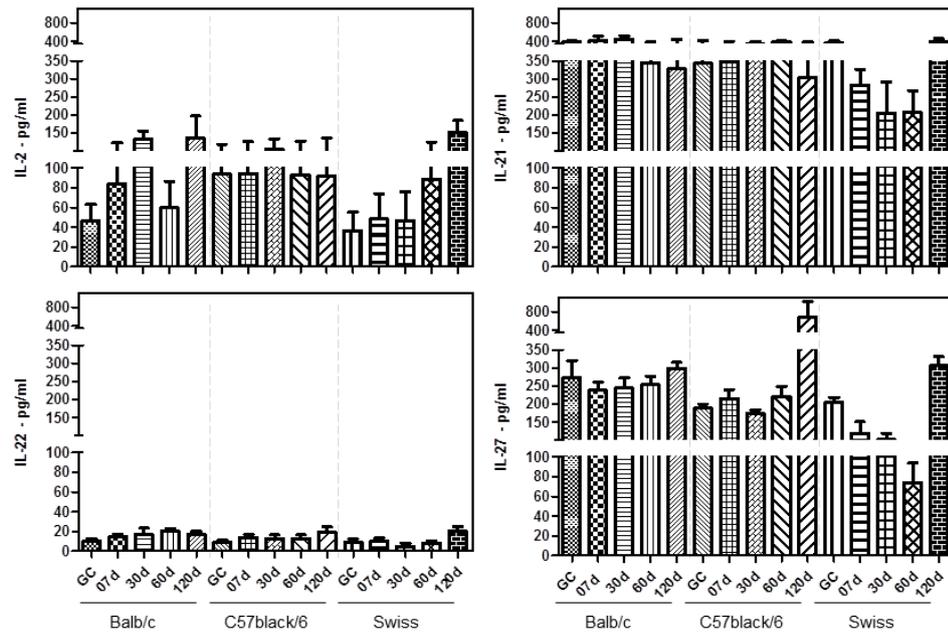


Figura 16 – Determinação da produção das citocinas IL-02, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas para a citocina **IL-27** apresentou diferença para os animais *C57Black/6* ( $p = 0,0443$ ), onde: 120 d > GC = 30 d, e para a linhagem *Swiss* ( $p = 0,0016$ ), revelando que: GC > 07 d = 30 d = 60 d. Não foi detectada diferença estatística significativa para as citocinas **IL-02**, **IL-21** e **IL-22**.

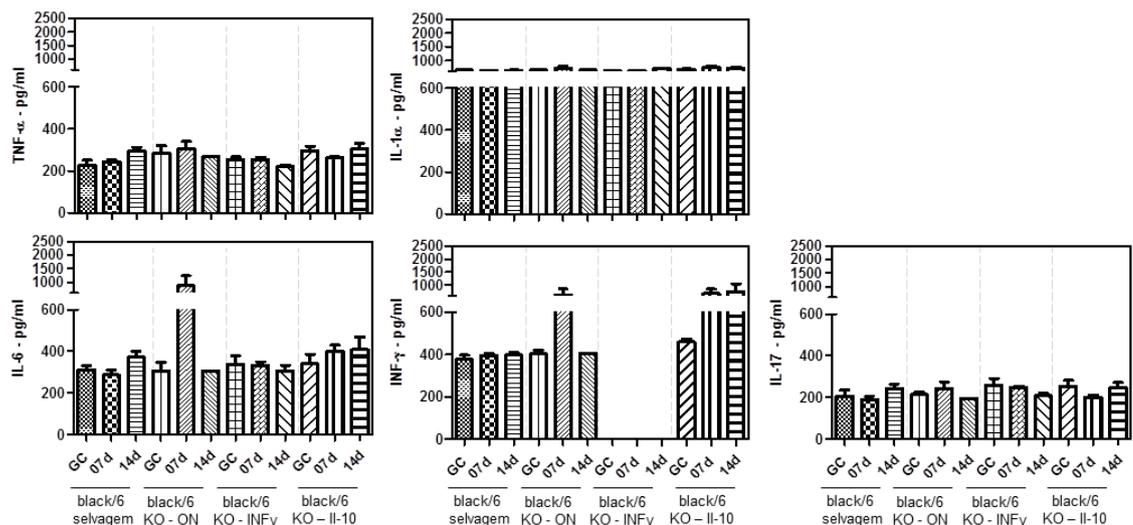


Figura 17 – Determinação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6*-KO-ON, *C57Black/6*-KO-INF- $\gamma$  e *C57Black/6*-KO-IL-10. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde a quantificação foi realizada por

citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas da citocina **IL-1 $\alpha$** , para os animais *C57Black/6-KO- $INF\gamma$*  ( $p = 0,0236$ ), revelando: 07 d > 14 d = GC. Não foi realizada a quantificação da citocina  $INF\gamma$  nos animais *C57Black/6-KO- $INF\gamma$* . Não foi possível detectar diferenças estatísticas significativas para **TNF- $\alpha$** , **IL-6**,  **$INF\gamma$**  e **IL-17**.

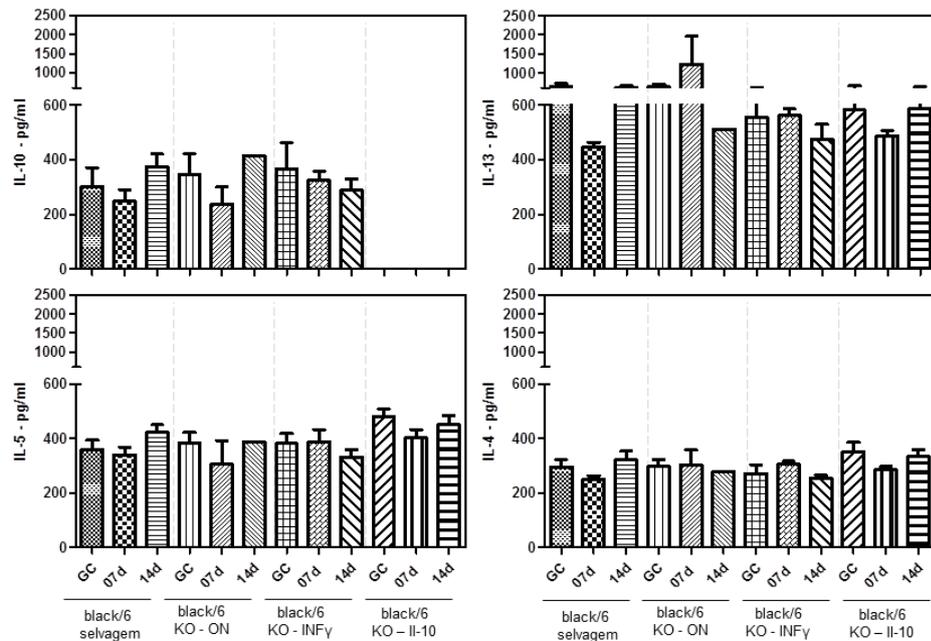


Figura 18 – Determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO- $INF\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas para a citocina **IL-13**, para o grupo de animais *C57Black/6 selvagem* ( $p = 0,0188$ ), apresentando: 14 d = GC > 07 d. Não foi realizada a quantificação da citocina IL-10 para os animais *C57Black/6-KO-IL-10*. Não foi detectada diferença estatística significativa para as citocinas **IL-10**, **IL-5** e **IL-4**.

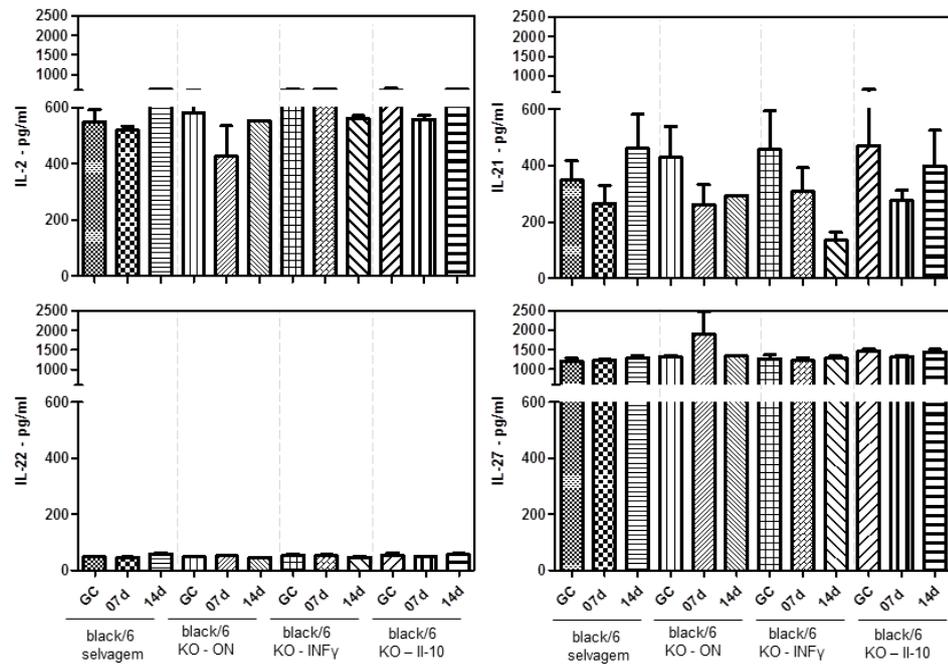


Figura 19 – Determinação da produção das citocinas IL-02, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^7$ /ml da estirpe T1 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa para a citocina **IL-21** para o grupo *C57Black/6-KO-INF $\gamma$*  ( $p = 0,0203$ ), revelando: 14 d < GC. A citocina **IL-22**, no grupo *C57Black/6 selvagem* ( $p = 0,0329$ ), tendo 14 d > 07 d = GC. Não foi detectada diferença estatística significativa para as citocinas **IL-02** e **IL-27**.

**Avaliação da Resposta Imune em Diferentes Linhagens de Camundongos Após Infecção com uma Linhagem Selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis***

Ricardo Evangelista Fraga<sup>a,b</sup>; Heidiane Alves<sup>a</sup>; Milton Galdino Oliveira Neto<sup>a</sup>; Marcos da Costa Silva<sup>a</sup>; Andréia Pacheco<sup>a</sup>; Geraldo Pedral Sampaio<sup>a</sup>; Vera Vale<sup>a</sup>; Roberto Meyer<sup>a,c</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil. <sup>b</sup> Núcleo de Tecnologia em Saúde, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil. <sup>c</sup> Membros do INCT-DT/MCT/CNPq.

**\*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- 9966-9056

Fax: 55-71-3235-9682

Endereços de e-mail: ricardo.fraga@ufba.br (R. Fraga)

rmeyer@ufba.br (R. Meyer)

## Resumo

Este estudo foi executado com a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (C.p.), microrganismo intracelular facultativo, agente da linfadenite caseosa, doença infectocontagiosa crônica, responsável por grandes perdas econômicas na caprinocultura. Teve como objetivo estudar o perfil da resposta imune estabelecida durante o percurso da infecção por uma estirpe recentemente coletada de um caprino naturalmente infectado (C57) em diferentes linhagens de camundongos. Para tanto, diferentes linhagens de camundongos, foram infectados com  $10^2$ /ml de C57. Os animais foram divididos da seguinte forma: 28 *Swiss*; 28 *Balb/c*, 35 *C57Black/6* selvagem, 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para Óxido Nítrico (ON), 14 *C57Black/6-KO* para  $\text{INF-}\gamma$  e 14 *C57Black/6-KO* para IL-10. Cada linhagem de camundongo foi dividida em dois grupos (controle e teste). Após a infecção os animais *Swiss*, *Balb/c* e *C57Black/6* selvagens, foram avaliados nos tempos 07, 30, 60 e 120 dias. Enquanto que para os animais *C57Black/6* selvagens e *knockout*, foram analisados aos 07 e 14 dias. Foi realizada a construção da curva de mortalidade; avaliação morfológica (presença de granuloma e peso do baço); avaliação do direcionamento celular para o local da infecção (quantidade total e diferencial de células peritoneais); produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ,  $\text{INF-}\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2, IL-17 por células aderentes peritoneais; imunofenotipagem (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>); bem como a mensuração das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27,  $\text{INF-}\gamma$  e TNF- $\alpha$  no homogenato do baço. Através da avaliação dos resultados obtidos é possível identificar que os animais *C57Black/6* são mais resistentes, uma vez que estes animais apresentaram direcionamento celular para o local da infecção, como também produção de citocinas por células fagocíticas compatíveis com uma atuação bem sucedida frente a infecções por microrganismos intracelulares facultativos e apresentaram tendência em estabelecer resposta do tipo Th1, com produção de  $\text{INF-}\gamma$ , IL-22 e IL-27. Por outro lado, os animais *Balb/c* e *Swiss* demonstraram ser mais susceptíveis a infecção, principalmente por apresentarem uma diminuição das células T durante o percurso da infecção apresentando uma dificuldade na produção de citocinas relacionadas ao perfil Th1, tão importantes para enfrentar de forma efetiva este microrganismo. Além de demonstrar a importância/envolvimento do ON,  $\text{INF-}\gamma$  e da IL-10 para a eliminação ou estabelecimento da infecção, já que os animais KO-IL-10 demonstraram ser mais resistentes, enquanto que os animais KO-ON e KO- $\text{INF-}\gamma$  foram mais sensíveis à infecção.

**Palavras-chaves:** Linfadenite caseosa. Camundongos. Resposta Imune.

## 1. Introdução

A linfadenite caseosa, doravante (LC), também conhecida como mal do caroço, é uma doença infectocontagiosa crônica, que acomete principalmente os pequenos ruminantes (caprinos e ovinos), entretanto, pode eventualmente causar linfagite ulcerativa em equinos e dermatite ulcerativa em bovinos, búfalos e cervos (BENHAM et al., 1962; BATEY, 1986a; BATTEY & TONGE, 1968; CAMERON & MINNAR, 1969; LOPEZ et al., 1966; ZAKI, 1976). A LC não é considerada uma zoonose, entretanto já foram registrados casos humanos relacionados com este microrganismo, geralmente referido a uma exposição ocupacional (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997; LIU et al., 2005).

É ocasionada por um cocobacilo gram-positivo denominado *Corynebacterium pseudotuberculosis*, microrganismo intracelular facultativo de macrófagos (KIMBERLING, 1988; PEKELDER, 2000; MEYER et al., 2002; RADOSTITS et al., 2002; ANDERSON, RINGS, PUGH, 2005). Esta doença é caracterizada pela formação de lesões granulomatosas, que podem acometer tanto regiões superficiais dos animais, principalmente nos gânglios linfáticos superficiais, como também órgãos internos como pulmões, baço, rins e fígado (KIMBERLING, 1988; BERNABÉ et al., 1991; SMITH & SHERMAN, 1994; PEKELDER, 2000; SOBRINHO, 2001; DORELLA et al., 2006c; CRAWSHAW et al., 2008).

A LC no estado da Bahia [que corresponde ao maior rebanho de caprinos do Brasil (BRASIL, 2010)] é a responsável de grandes perdas econômicas, principalmente para os pequenos produtores que tem na caprinocultura a essencial fonte de renda familiar (RIBEIRO et al., 1988; MOURA-COSTA, 2002; MEYER, 2004; DORELLA et al., 2006a). Esta patologia é a responsável por comprometimento do couro, além de poder ocasionar perda de peso, desordens reprodutivas (como abortos e mortalidade neonatal), diminuição da produção de carne e lã, condenação da carne (NAIRN & ROBERTSON, 1974; AYERS, 1977; ASHFAQ & CAMPBELL, 1979; BURRELL, 1981; EGGLETON et al., 1991; ALONSO et al., 1992) e diminuição da produção de leite, em virtude da alta prevalência de granulomas mamários (BURRELL, 1981).

A resposta imune adaptativa eficaz contra a infecção por *C. pseudotuberculosis* está relacionada principalmente com as células da subpopulação Th1, que intensifica a atuação do IFN-gama produzido nas fases iniciais da infecção promovendo ativação de macrófagos infectados e estimulando a produção da enzima óxido nítrico sintetase induzida que catalisa a

geração de óxido nítrico (NO), o qual proporciona a destruição dos microrganismos (VALE, 2000; BURMESTER & PEZZUTO, 2003).

Os estudos com modelos experimentais murinos permitiram avanços no entendimento da patogênese da *C. pseudotuberculosis*. As primeiras observações das infecções de camundongos com estas bactérias foram realizadas no século XX (WOLFF, 1950), a partir de então, os camundongos representam uma importante ferramenta, uma vez que estes animais apresentam sinais clínicos, perfil de hemograma e bioquímica sérica, bem como as alterações histopatológicas em órgãos viscerais similares aos observados em pequenos ruminantes (VALE, 2005; SOUZA, 2009; SILVA, 2010; JESSE, et al., 2011). Ademais, a possibilidade de realizar a remoção de um gene de interesse nesta espécie, produzindo animais *knockout*, cada vez mais vem sendo aplicado com a finalidade de implementar a compreensão a respeito do envolvimento de determinados elementos da resposta imune frente a diversas infecções (CHORILLI et al. 2007).

Por este motivo, o presente trabalho tem como objetivo estudar o perfil da resposta imune estabelecida durante o desenvolvimento da infecção de diferentes linhagens de camundongos por uma estirpe recentemente coletada de um caprino naturalmente infectado, e desta forma estabelecer o padrão de resposta imune em animais susceptíveis e resistentes a esta bactéria considerada selvagem. Além disso, este trabalho objetiva também avaliar o envolvimento do óxido nítrico, INF-gama e da citocina IL-10 no início do processo infeccioso. O estudo destas linhagens com perfil de resposta imune oposto ao serem infectadas com este patógeno, permite aprofundar os conhecimentos a respeito da relação *parasito-hospedeiro*, e desta forma contribuir com as pesquisas para o estabelecimento de diversos protocolos de controle e tratamento da infecção, visando à modulação da resposta imune e consequente produção de vacinas, imunoterapia e kit diagnósticos para este microrganismo.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Para a realização da infecção dos animais e da cultura celular foi empregada a estirpe denominada C57, esta bactéria foi recentemente isolada de um caprino naturalmente infectado e identificada através da cultura de *Corynebacterium* spp., sorologia para Linfadenite Caseosa e PCR multiplex direto dos materiais dos granulomas para identificação de *C. pseudotuberculosis* caracterizada por PCR multiplex. Entretanto, para a produção de antígenos secretados (AsT1), utilizados nos ensaios de cultura celular, foi empregada a linhagem T1 deste microrganismo. Esta linhagem foi isolada de um caprino naturalmente infectado da região de Santa Luz-BA e doado pelo Dr. Artur Hage, pesquisador da EBDA, para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA) no ano 2000, onde foi realizada a identificação pelo teste “API coryne” (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França), e após sucessivas culturas em meio específico foi considerada atenuada por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa que estirpes recentemente coletadas de caprinos naturalmente infectados. A partir de então, esta linhagem é mantida, na coleção do Laboratório de Microbiologia do ICS – UFBA, sendo utilizada em diversos ensaios laboratoriais por promover uma infecção mais branda tanto em caprinos como em camundongos infectados experimentalmente.

Para a produção das proteínas secretadas (AsT1), quatro litros de cultura da T1 em meio de infusão de cérebro e coração - BHI - (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA); cultivados a 37°C, por 48 horas; foram utilizados, seguindo-se protocolo estabelecido por Paule *et al.*,(2003). Resumidamente, o cultivo foi centrifugado a 10.000xg por 15 minutos, seguido de filtração em membrana de diálise durapore em PVDF de 0,45µm (Millipore, Indústria e Comércio LTDA, São Paulo-SP), com o intuito de eliminar as bactérias presentes no meio. Em seguida, o sobrenadante foi fracionado em um procedimento composto por três fases (“Three Phase Partitioning” - TPP). Primeiro ocorreu à saturação com 30% de sulfato de amônia (VETEC Química Final LTDA – Rio de Janeiro-RJ) a temperatura ambiente, sob leve agitação, em seguida o pH foi ajustado para 4.0, e foi acrescentado n-butanol (VETEC Química Final LTDA – Rio de Janeiro-RJ) na mesma proporção do volume do meio de cultura BHI (04L), seguido de uma agitação vigorosa durante um minuto. Este material então

foi mantido em repouso durante uma hora, para promover a precipitação protéica. O precipitado foi coletado, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, e novamente centrifugado a 1350xg durante 10min. e a interface foi coletada e dissolvida em cinco 05 ml de tampão Tris 20 mM, pH 7,4. Este material foi então submetido à diálise contra Salina Tamponada com Fosfato - PBS, pH 7.2, realizada em três banhos de 08 horas a 4°C. Para a determinação protéica foi empregado o método de Lowry (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Califórnia-USA). As amostras, antes de serem armazenadas a - 20°C, foram acondicionadas em um saco contendo gelo, e foram submetidas à esterilização por exposição à luz ultravioleta durante 15 min.

Com a finalidade de promover a infecção, tanto dos animais testados, quanto das células aderentes da cavidade peritoneal, a quantificação bacteriana foi realizada, seguindo-se o protocolo estabelecido por Pedral (2012). Resumidamente, 05 mL, de uma cultura mantida durante 48h a 37°C de 250ml, foram retirados. Este material foi lavado duas vezes, em solução salina, através de centrifugações de 04 min. a 8.000xg. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescido o SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e incubou-se por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Nova lavagem foi realizada para a remoção dos reagentes e o sedimento bacteriano foi ressuspensão e mensurado no citômetro de fluxo. Para isso, foram utilizados tubos TruCount (Becton Dickson, EUA), contendo sedimento de microsferas fluorescentes, com a quantidade de *beads* constantes em cada lote. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo: Bactérias totais =  $(N^0 \text{beads eventos bactérias} / N^0 \text{ de beads A+B}) \times N^0 \text{ de Beads por } \mu\text{l}$ .

## 2.2 Animais

Para a realização deste experimento foram utilizadas diferentes linhagens de camundongos, sendo: da linhagem heterogênea - 28 *Swiss*; da linhagem isogênica - 28 *Balb/c*, 35 *C57Black/6* selvagem, 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para Óxido Nítrico (ON), 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para IFN-gama e 14 *C57Black/6 knockout* (KO) para interleucina dez (IL-10); perfazendo um total de 133 animais, com idade entre 06 - 08 semanas, de ambos os sexos. Os animais da linhagem *C57Black/6* (selvagem e *knockout*) foram adquiridos no Biotério da Fundação Oswaldo Cruz – RJ; os animais da linhagem *Balb/c* foram adquiridos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ-Salvador-BA) e os animais da

linhagem *Swiss* pelo Biotério da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (MEV-UFBA).

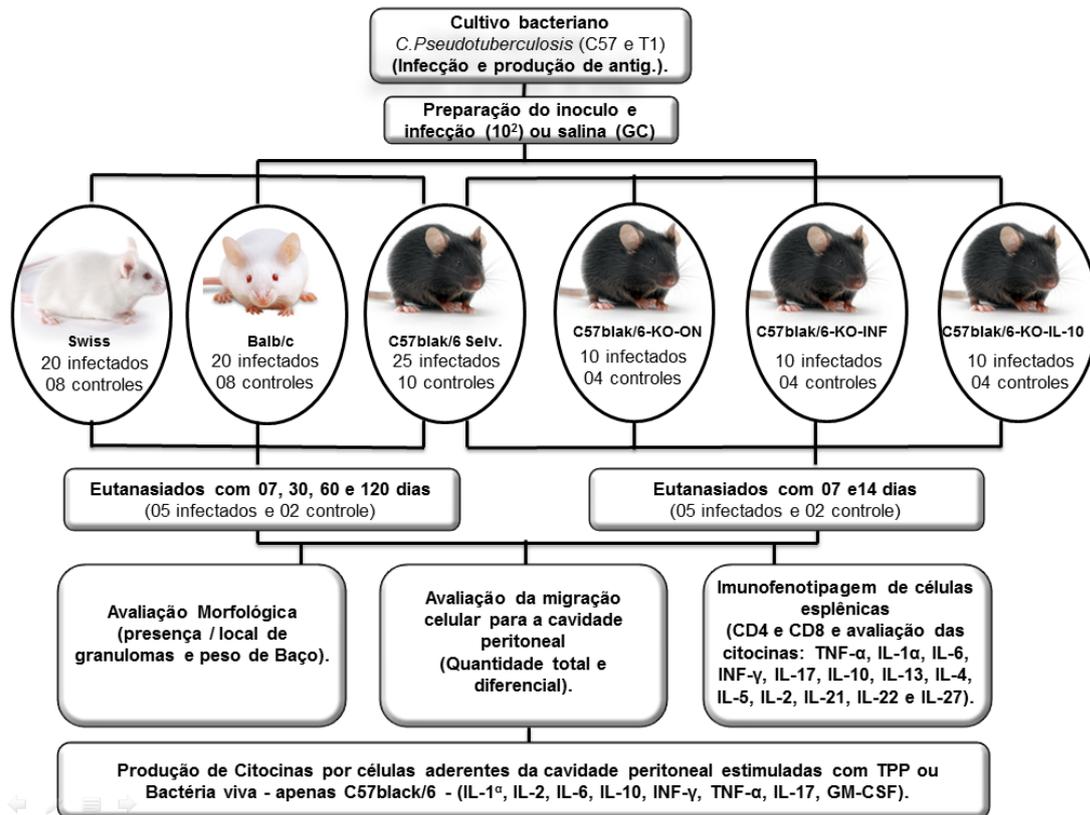
Os animais foram alojados em caixas de 30x19,5x12 cm, quatro a seis animais por caixa, ou em caixas de 41x34x16 com 20 animais cada, durante todo o período do experimento, no Biotério do Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA), sob condições adequadas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e de umidade (50 - 60 %). Os camundongos foram mantidos com alimentação e água *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, sob protocolo nº 006/2010.

### 2.3 Infecção

Cada linhagem de camundongo foi dividida em dois grupos (controle e teste), sendo que os grupos de animais *Swiss* e *Balb/c* tiveram 08 animais controle e 20 animais infectados, já o grupo *C57Black/6* selvagens foram divididos em 10 controles e 25 infectados. Por sua vez, os animais *C57Black/6 knockout* foram agrupados em 04 controles e 10 infectados. Os animais foram infectados com a linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis* na concentração de  $10^2/\text{ml}$  diluídos em um (01) ml de salina (ISO FAR, Duque de Caxias, RJ) que foi inoculado pela via intraperitoneal, enquanto que, os animais controle receberam um (01) ml de salina (ISO FAR, Duque de Caxias, RJ) pela mesma via.

Após a infecção os animais do experimento 01, que se referiam aos camundongos *Swiss*, *Balb/c* e *C57Black/6* selvagens, foram avaliados nos tempos 07, 30, 60 e 120 dias, e enquanto que para os animais do experimento 02, *C57Black/6* selvagens e *knockout*, foram analisados com 07 e 14 dias. Em cada tempo examinou-se cinco (05) animais infectados e dois (02) animais controles, de cada grupo estudo, foram eutanasiados por deslocamento cervical (desenho experimental 02).



## 2.4 Avaliação Morfológica

### 2.4.1 Presença e Localização de Granuloma

Em seguida à eutanásia os camundongos foram vistoriados, tanto externamente quanto na abertura das cavidades peritoneal e torácica, para a observação da existência de granulomas, bem como, do local de sua ocorrência.

### 2.4.1 Determinação do peso do baço

Após a eutanásia dos animais, em cada ponto avaliado, o peso corporal, seguido pelo do baço, foram obtidos utilizando Balança de precisão (Marte Balança e Aparelhos de Precisão LTDA, São Paulo-SP). A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%.

## 2.5 Avaliação da Resposta Imune

A avaliação da resposta imune das diferentes linhagens de camundongos infectados com a bactéria C57 de *C. pseudotuberculosis* foi estimada tanto em relação à resposta imune inata, quanto em relação à resposta imune adaptativa, na sua vertente celular.

### 2.5.1 Resposta Imune Inata

#### 2.5.1.1 Avaliação da migração celular para a cavidade peritoneal

A avaliação da migração celular para a cavidade peritoneal (local da realização da injeção) foi realizada através da quantificação total de células e do diferencial destas. Com este intuito, após a eutanásia, procedeu-se a assepsia do abdômen e exposição do peritônio, seguidamente, foi injetado, em condições assépticas, 1,5mL de salina estéril (ISO FAR, Duque de Caxias, RJ). Em seguimento, foi realizada uma massagem, por em média 30 segundos, e este material foi recuperado. Após definição do volume readquirido, este foi acondicionado em microtubos eppendorf, dos quais 40µl foram utilizados para contagem de células totais através de um contador automático de células (Hemocytometer CELM cc-530, CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri-SP), 60µl foram utilizados na preparação de citoesfregaço, em duplicata, através de centrifugações de 16 minutos a 500xg em temperatura ambiente, utilizando uma citocentrífuga de bancada Presvac CT12 (Prevac, Balneario Camboriu - Santa Catarina fabricante), e o restante da suspensão foi encaminhada para a cultura celular dos animais *C57Black/6*.

As lâminas do citoesfregaço foram coradas utilizando-se para isso uma mistura dos corantes hematológicos *Wright* e *Giemsa* (Sigma Chemical Co., EUA). Resumidamente, as lâminas foram cobertas com 15 a 20 gotas do corante, deixando-o agir por três (03) minutos, seguidamente foi acrescido 20 gotas de água destilada por 12min., finalizando com uma lavagem em água corrente. O perfil das células da cavidade foi determinado através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal, utilizando-se para isso um microscópio Biológico binocular modelo L-1000 bac (Bioval, Bauru-SP) em objetiva de imersão (aumento de 1000X).

### 2.5.1.2 Avaliação da Produção de Citocinas por Células Aderentes

Com o propósito de caracterizar as citocinas produzidas por células aderentes após o estímulo com antígenos secretados ou com a bactéria C57 viva, células da cavidade peritoneal dos camundongos *C57Black/6* foram cultivadas. Para isso, as células recuperadas, como descritas anteriormente, foram lavadas duas vezes utilizando-se salina (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ) através de centrifugações de 1500xg, por 10 minutos, a 4°C. Ao final, cada sedimento celular foi ressuspensão em um (01) ml de meio RPMI 1640 suplementado, e em seguida realizou-se nova contagem de células utilizando o contador automático (Kacil Indústria e Comércio LTDA, Recife-PE). Estas foram ajustadas para  $2 \times 10^5$ /ml e incubadas em placas de 24 poços, de poliestireno, de fundo chato (Costar Corning Inc., Nova Iorque, EUA), a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sup>2</sup>, por 24 horas em incubadora (Costar Corning Inc., Nova Iorque, EUA).

As células dos animais *C57Black/6* selvagens infectados com a linhagem C57 após 14 dias de infecção e os animais controles dos pontos 14 e 30 (logo 05 animais infectados e 04 controles) foram estimuladas com antígeno secretado (AsT1), para isso, após 24hr do plaqueamento, os poços foram lavados, com o objetivo de remover as células não aderentes, e, posteriormente, estimuladas com apenas meio, ou 10µg/mL de Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*-LPS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), referente ao controle positivo, ou 40µg/mL do antígeno da linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*. As placas foram incubadas por mais 24hr nas mesmas condições anteriores e, depois disso, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C.

Por sua vez, as células dos animais *C57Black/6* selvagem e KO-ON, KO-INF-γ e KO-IL-10, também referentes ao 14° dia de infecção, foram cultivadas, após a remoção das células não aderentes, na proporção de 1:5 (uma célula aderente para cinco bactérias vivas) com C57 em meio RPMI suplementado, sem a presença de antibiótico. Para isso, bactérias C57 viáveis foram quantificadas, como descrito anteriormente, e adicionadas a cultura celular após 24hr, depois de 1h30 min procedeu-se a coleta do sobrenadante e posterior armazenamento a -20°C. Em seguimento, as células aderidas foram ressuspensas, utilizando tripsina, para realizar a construção de citoesfregaço, e assim confirmar a infecção/fagocitose pelo microscópio óptico, após coloração com uma mistura dos corantes hematológicos *Wright* e *Giemsa*, como descrito anteriormente.

As citocinas mensuradas nos sobrenadantes das culturas foram IL-1α, TNF- α, INF-γ, GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2, IL-17, produzidas por macrófagos e outras células aderentes.

Estas citocinas foram detectadas por Citometria de Fluxo utilizando *Kit* comercial TH1/TH2 mouse 10 plex – Flow Cytomix (eBioscience: Bender MedSystems GmbH). Resumidamente, os padrões das citocinas avaliadas foram reconstituídos em água destilada estéril de acordo com a concentração previamente recomendada no *Kit*, para serem utilizadas na elaboração de um *mix* de citocinas, que por sua vez, foi empregado na elaboração de uma diluição seriada, utilizada como a curva padrão do ensaio. Posteriormente, foi elaborado o *mix* das *beads* de captura, onde as *beads* referentes a cada citocina analisada foram agrupadas em um tubo Falcon de 15ml e centrifugadas a 7500xg por 05 minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente desprezado e o sedimento resuspenso com o mesmo volume de tampão de ensaio. Seguidamente, o *mix* do conjugado biotinizado foi preparado também diluído em tampão de ensaio. Desta forma, o experimento foi realizado, adicionando em tubos previamente identificados a seguinte ordem: padrões das citocinas ou as amostras, em seguida o *mix* de *beads* e por ultimo o *mix* de conjugados biotinizados. Estes foram incubados ao abrigo de luz e a 4°C por duas (02) horas. Findado o período de incubação, foi adicionado um (01)ml do tampão de ensaio em cada tubo que foi seguido por uma centrifugação a 7500xg durante 05 minutos. Seguidamente, foi removido 700 µL do sobrenadante e novamente lavado com o mesmo volume de tampão, que foi seguido da remoção do sobrenadante e posterior adição de 20 µL de streptoavidina-PE. Os tubos foram então homogeneizados e incubados no escuro por uma (01) hora, ao passo que, findado este período, as amostras foram novamente lavadas duas vezes e por fim resuspenso em 500µL de tampão de ensaio e acondicionadas isentas da luz a 4°C *overnight*, para posterior leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o FlowCytomix Pro Software, conforme orientações do fabricante.

### 2.5.2 Resposta Imune Adaptativa

A avaliação da resposta imune adaptativa, na sua vertente celular, foi realizada através da mensuração da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> presentes no baço no momento da eutanásia de cada animal, através da imunofenotipagem realizada pela citometria de fluxo, além da quantificação de citocinas presentes neste órgão.

O baço de cada animal foi removido e transferido para uma placa de petri de 40x12mm, e após a sua pesagem, foi removido um fragmento de 30mg que foi macerado em 500 µL de solução inibidora de proteases (Sigma Aldrich Brasil Ltda.) gerando uma suspensão celular.

Cada suspensão foi submetida a centrifugação a 450xg por 10 minutos à 4°C. A partir de então, o sobrenadante das amostras foi adequadamente armazenado à - 20°C para serem utilizados na quantificação de citocinas. Enquanto que, o sedimento celular foi ressuspensão em três (03)ml de salina, 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.

A imunofenotipagem foi realizada pela avaliação da expressão das proteínas CD3, CD4 e CD8 na superfície celular. Para tanto, foram utilizados anti-CD3 conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-CD8a conjugado com PE-Cy®5.5 e anti-CD4 conjugado com R-PE (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Todos os anticorpos monoclonais (AcMO) foram previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso. As células esplênicas foram ajustadas em 500.000 células (eventos) diluídas em 500 µL do tampão de ensaio, em seguida os anticorpos monoclonais foram acrescentados e esta mistura foi incubada, em câmara escura, durante 15 minutos. Findado o período de incubação, foi adicionado um (01) ml do tampão de ensaio em cada tubo, e em seguida foi realizada uma centrifugação a 7500xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e acrescentado 500µL de tampão de ensaio. 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).

A dosagem das citocinas presentes no homogenato do baço foi realizada através de ensaio para detecção por Citometria de Fluxo, utilizando-se para isso, *Kit* comercial 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, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , como descrito anteriormente.

## 2.6 Análise Estatística

Com o objetivo de avaliar aspectos da relação *parasito-hospedeiro* durante a infecção com linhagem C57 de *C. pseudotuberculosis* em diferentes linhagens de camundongos, considerando a avaliação morfológica, a avaliação da migração para a cavidade peritoneal, a imunofenotipagem de esplenócitos e a dosagem de citocinas, tanto presentes em células aderentes, quanto no homogenato do baço, 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 (BIOSTAT, 2007; FISHER, 1993;) e as tendências centrais dos grupos independentes, dois a dois, foram comparadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney (CALLEGARI-JACQUES, 2003). O valor fixado para significância estatística foi de  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

Com o propósito de caracterizar a resposta imune de diferentes linhagens de camundongos infectados com uma bactéria recém-coletada de um caprino naturalmente infectado (C57), aqui considerada como uma linhagem selvagem, foi descrita uma avaliação morfológica, bem como, uma caracterização da resposta imune, tanto na sua vertente da resposta imune inata, quanto adaptativa. Todas as médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ), de cada experimento realizado, encontram-se no apêndice B.

#### 3.1 Experimento 01

Neste item serão descritos os resultados observados nos animais *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss* avaliados com 07, 30, 60 e 120 dias após a infecção com a bactéria C57. Neste ensaio foi registrado um óbito, no grupo *Swiss*, com 98 dias de infecção.

##### 3.1.1 Avaliação Morfológica

A análise morfológica foi realizada pela avaliação do surgimento de granulomas, assim como, dos locais onde sucederam a sua ocorrência. Além disso, foi realizada uma avaliação referente ao peso do baço.

Os animais *Balb/c* apresentaram granulomas com 30 dias (03 animais em relação aos 05 – 03/05), e em cada um destes foi observado apenas um granuloma no rim e dois em linfonodos. Na linhagem *C57Black/6* foi observado o aparecimento dos granulomas em dois animais com 60 dias de infecção, estes sendo um em rim e o outro no linfonodo. Nos *Swiss* foram identificados com 30 dias (01/05) e com 60 dias (01/05), para estes dois animais o órgão comprometido foi o linfonodo (Tabela 1 e 2).

Os valores encontrados referentes à relação entre o peso corporal e o peso do baço estão apresentados na figura 02, onde a comparação entre os dias da infecção com o grupo controle, caracterizado pela união de todos os animais controles eutanasiados com 07, 30, 60 e 120 dias, realizada por Kruskal-Wallis, não revelou diferença entre os dias nos três grupos testados, entretanto ao se comparar em cada dia as três linhagens de camundongos foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0308$ ) para o ponto sete (07d), que após a avaliação onde foi realizada a comparação pelo Mann-Whitney, apresentou a seguinte relação: *Balb/c* = *C57Black/6* > *Swiss* e com 120d ( $p = 0,0106$ ), apresentando a relação: *Balb/c* > *C57Black/6* = *Swiss*.

### 3.1.2 Avaliação da Resposta Imune

Para a caracterização da resposta imune das diferentes linhagens de camundongos estudadas neste ensaio foram avaliadas a resposta imune inata, com a determinação da quantidade total, bem como o diferencial, de células da cavidade peritoneal e as produções de citocinas por estas células. Assim como a imunofenotipagem para CD4 e CD8 e a as citocinas produzidas no macerado do baço.

#### 3.1.2.1 Avaliação da Resposta Imune Inata

A avaliação da resposta imune inata foi caracterizada pela quantificação total e diferencial de células recuperadas da cavidade peritoneal após a eutanásia dos animais. A Figura 02 representa os valores encontrados da quantificação total, na qual é possível notar a diferença estatística nos animais *Balb/c*, com  $p = 0,0003$  e a seguinte relação pós-teste:  $120d > 07d > 30d > 60d = GC$ . Já para os animais *C57Black/6* foi possível observar  $p = 0,0032$ , e a seguinte relação:  $120d > 60d > 30d = 07d = GC$ ; e para os animais *Swiss*, com  $p = 0,0015$ , revelando no pós-teste que  $60d > 07d = 30d = 120d > GC$ .

Os valores relacionados com o diferencial destes grupos apresentaram, na avaliação por Kruskal-Wallis, os seguintes valores para a linhagem *Balb/c*: Macrófagos ( $p = 0,0024$ ), tendo como pós-teste a relação –  $120d > 07d = 30d > GC = 60d$ ; Linfócitos ( $p = 0,0004$ ), apresentando –  $120d > GC = 07d > 30d = 60d$  e Neutrófilos ( $p = 0,0117$ ), com pós-teste –  $GC < 07d = 30d = 60d = 120d$ . Para os animais da linhagem *C57Black/6*, os macrófagos ( $p =$

0,0086), e pós-teste - 07d = 120d > GC = 30d; os Linfócitos ( $p = 0,0005$ ), e relação - 120d = 60d > 07d=30d, 120d > GC e os Neutrófilos ( $p = 0,0001$ ), e pós-teste 07d = 30d > 60d = 120d. Já a linhagem *Swiss* os macrófagos ( $p = 0,0015$ ), pós-teste: GC = 07d = 120d = 30d > 60d; os linfócitos ( $p = 0,0024$ ), pós-teste: 30d = 60d = 120d > GC = 30d e os neutrófilos ( $p = 0,0024$ ), apresentando no pós-teste: 07d > GC = 60d = 120d, 30d > GC. (figura 03).

### 3.1.2.2 Avaliação da produção de Citocinas por Células Aderentes

Na figura 04 é demonstrado os resultados alcançados quando células aderentes da cavidade peritoneal dos camundongos *C57Black/6* selvagens foram cultivadas com 40µg/ml de antígenos secretados da bactéria T1. É possível observar uma diferença estatística significativa, através do teste de Kruskal-Wallis, na produção das seguintes citocinas: IL-1 $\alpha$  ( $p = 0,0070$ ), e o pós-teste realizado pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney, entre as células que receberam apenas meio com as que foram estimuladas com os antígenos da T1, no grupo infectado possui  $p = 0,0079$ ; IL-6 ( $p = 0,0443$ ) com pós-teste para o grupo infectado com  $p = 0,0362$ ; IL-10 ( $p = 0,0048$ ) onde a relação das células que receberam apenas meio ou receberam os antígenos secretados do grupo controle possuem um  $p = 0,0286$  e no grupo infectado  $p = 0,0119$ ; INF- $\gamma$  ( $p = 0,0122$ ) e pós-teste para o grupo infectado com  $p = 0,0273$  e para a citocina GM-CSF ( $p = 0,0096$ ) e pós-teste para o grupo infectado com  $p = 0,0119$ . Não foram observadas diferenças nas citocinas IL-2, TNF- e IL-17.

### 3.1.3 Avaliação da Resposta Imune Adaptativa

As médias de intensidade de fluorescência (MIF) são avaliadas na figura 05, onde, para o MIF de CD4, os animais *C57Black/6* apresentam uma diferença estatística significativa, com  $p = 0,0456$ , pelo teste de Kruskal-Wallis, apresentando a seguinte relação: 60d > 120d = 07d, pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney. Os animais *Swiss* com  $p = 0,0059$ , e pós-teste revelando que: 60d = 120d > 07d = 30d, 60d > GC. Para o MIF de CD8 foi possível detectar uma diferença estatística significativa nos animais *Balb/c*, com  $p = 0,0033$ , e pós-teste: 120d > GC = 07d < 30d = 60d, nos animais *C57Black/6*, tendo  $p = 0,0096$  e pós-teste: 07d > GC, 60d, 120d, 120d > 60d, e para o grupo *Swiss*, com o  $p = 0,0029$ , onde GC = 60d = 120d > 30d = 60d.

Para a análise da produção das citocinas, elas foram agrupadas em citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17), citocinas Th3 e Th2 (IL-10, IL-13, IL-4 e IL-5), e citocinas relacionadas ao direcionamento do perfil Th1 e Th2 dos linfócitos T (IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27). Para o primeiro grupo de citocinas é possível observar uma diferença estatística significativa para a citocina IL-1 $\alpha$ , no grupo *Balb/c* ( $p = 0,0022$ ), tendo como relação: 120d = 60d > 30d = 07d > GC. O grupo *C57Black/6* apresentou diferença estatística ( $p = 0,0021$ ) para a citocina IL-1 $\alpha$ , apresentando na relação: 120 > 60d = GC < 07d = 30d. Já o TNF- $\alpha$  do grupo *Swiss* ( $p = 0,0208$ ), onde o GC = 60d > 07d = 30d e de INF- $\gamma$  ( $p = 0,0062$ ), com pós-teste: 60d > GC > 07d = 30d. Não foi possível detectar diferenças para IL-6 e IL-17 (figura 06). Apresentaram diferença estatística significativa também a citocina IL-13, no grupo *C57Black/6* ( $p = 0,0391$ ), apresentando no pós-teste: 120d > 30d = 60d = 07d = GC e não foi observadas alterações nas citocinas IL-10 e IL-5 e IL-4 do grupo de citocinas referentes ao perfil Th3 e Th2 (figura 07). Já para as citocinas relacionadas ao direcionamento Th1 e Th2, foi possível detectar, no *Balb/c* a produção de IL-2 ( $p = 0,0450$ ), tendo a seguinte relação: 30d = 60d > GC. Para o grupo *C57Black/6* as citocinas IL-22 ( $p = 0,0235$ ), pós-teste: 120d = 60d > GC = 07d > 30d e IL-27 ( $p = 0,0023$ ), pós-teste: 120d > GC = 07d = 30d = 60d. Para o grupo *Swiss* foi demonstrada uma diferença para as citocinas IL-2 ( $p = 0,0379$ ), pós-teste: 60d = 120d > GC = 07d = 30d e IL-27 ( $p = 0,0039$ ), pós-teste: 60d = 120d > GC = 07d = 30d. Não foram detectadas mudanças significativas na produção de IL-21 para nenhum dos grupos avaliados (figura 08).

## 3.2 Experimento 02

Neste item serão descritos os resultados observados nos animais *C57Black/6* selvagens e KO-ON, KO-INF- $\gamma$  e KO-IL-10.

### 3.2.1 Avaliação Morfológica

A frequência de granulomas, bem como a sua localização anatômica, foi observada apenas para os animais *C57Black/6*-KO-ON, que apresentou um granuloma em linfonodo com 07 dias após a infecção (Tabela 3 e 4).

Na descrição da avaliação da proporção do baço com o peso do animal foi detectado uma diferença significativa apenas para os animais *C57Black/6* ( $p= 0,0477$ ), revelando uma relação onde o 07d > 14d (Figura 09).

### 3.2.2 Avaliação da Resposta Imune

Para a caracterização da resposta imune dos animais *C57Black/6* selvagem e *knockout* foram realizados os mesmos procedimentos relacionados ao primeiro experimento, para a resposta imune inata, com a determinação da quantidade total, bem como o diferencial, de células da cavidade peritoneal e as produções de citocinas por estas células. Além da imunofenotipagem para CD4 e CD8 e das citocinas produzidas no macerado do baço.

#### 3.2.2.1 Avaliação da Resposta Imune Inata – Caracterização celular

Na figura 10, é avaliado os resultados observados ao se avaliar a quantidade total de células da cavidade peritoneal dos animais *C57Black/6* selvagens e *knockout*. É possível observar uma diferença estatística significativa apenas nos animais *C57Black/6-OK- $\text{INF}\gamma$*  ( $p = 0,0164$ ), e na avaliação pós-teste revelou a seguinte relação: 07d > 14d = GC.

Na figura 11 é visto a contagem diferencial referente das células peritoneais, nela é possível atentar para os seguintes achados: *C57Black/6* selvagem com neutrófilos ( $p = 0,0113$ ) onde 14d = 07d > GC; o grupo *C57Black/6-OK-ON* com os neutrófilos ( $p = 0,0096$ ) com 14d = 07d > GC; os *C57Black/6-OK- $\text{INF}\gamma$*  para os linfócitos ( $p = 0,0159$ ) onde 07d > 14d = GC, e os neutrófilos ( $p = 0,0040$ ) e o pós-teste: 07d > 14d > GC; para o grupo *C57Black/6-OK-IL-10* os neutrófilos com ( $p = 0,0096$ ), tendo o 14d = 07d > GC.

#### 3.2.2.2 Avaliação da produção de Citocinas por Células Aderentes

Ao se avaliar as culturas das células dos animais *C57Black/6* selvagem e KO-ON, KO- $\text{INF-}\gamma$  e KO-IL-10 com a bactéria C57 viável na proporção de 1:5, onde era observado um macrófago para cada cinco bactérias, é possível observar a produção estatisticamente significativa das citocinas: TNF- $\alpha$  para os animais *C57Black/6* selvagem ( $p = 0,0298$ ) e pós-

teste no grupo infectado com  $p = 0,0294$ , para o grupo *C57Black/6-KO- $\text{INF-}\gamma$*  ( $p = 0,0125$ ) com pós-teste no grupo controle com  $p = 0,0138$ , e para o grupo infectado de  $p = 0,0119$  e para os animais *C57blacC57Black/6-KO-IL-10* ( $p = 0,0156$ ), com pós-teste para o grupo infectado de  $p = 0,0119$ . A produção da citocina IL-6 para os animais *C57Black/6-KO-IL-10* ( $p = 0,0271$ ) e pós-teste no grupo infectado de  $p = 0,0119$ . Para a produção da citocina GM-CSF para os animais *C57Black/6-KO-IL-10* ( $p = 0,0171$ ) no grupo infectado, com  $p = 0,0097$  e para a citocina IL-17 foi observado uma diferença estatística significativa no grupo *C57Black/6-KO-ON* ( $p = 0,0262$ ), tendo no pós-teste, para o grupo dos animais infectados um  $p = 0,0159$ . Não foi observada uma diferença estatística ao se analisar as citocinas: IL-1 $\alpha$ ,  $\text{INF-}\gamma$ , IL-10 e IL-2 (Figura 12).

A avaliação da infecção/fagocitose foi confirmada pela visualização de macrófagos com vacúolos intracelulares e presença de bactérias no citoplasma (Figura 13).

### 3.2.3 Avaliação da Resposta Imune Adaptativa

As médias de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão de CD4 nos animais apresentaram diferença estatística significativa no grupo *C57Black/6-KO-ON* ( $p = 0,0365$ ) tendo o GC >14d; para os animais *C57Black/6-KO- $\text{INF-}\gamma$*  ( $p = 0,0286$ ), onde GC = 07d > 14d e para os animais *C57Black/6-KO-IL-10* ( $p=0,0079$ ), revelando que 07d < 14d = GC. O MIF para CD8 apresentou, nos animais *C57Black/6-KO-ON* ( $p = 0,0107$ ), onde 14d>07d = GC; para os animais *C57Black/6-KO-IL-10* ( $p = 0,0099$ ), e análise pós-teste: 07d > 14d = GC (Figura 14).

Para a avaliação das citocinas produzidas durante o momento da eutanásia dos animais o macerado do baço foi avaliado e foi percebido uma diferença estatística significativa, no grupo das citocinas pró-inflamatória, para a citocina IL-1 $\alpha$  para os animais *C57Black/6-KO- $\text{INF}\gamma$*  ( $p = 0,0140$ ), revelando que 07d > 14d = GC., não foram relatados diferenças significativas para as citocinas IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$  e  $\text{INF-}\gamma$  (Figura 15). Não sendo, também, detectadas diferenças estatísticas nos grupos das citocinas do perfil Th3 e Th2 (IL-10, IL-13, IL-05 e IL-04) (Figura 16) e nem das citocinas relacionadas ao direcionamento dos perfis Th1 e Th2 (IL-2, IL-22, IL-27 e IL-21) (Figura 17).

#### 4. Discussão

Buscando avaliar a resposta imune no percurso da infecção por uma estirpe selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis* animais *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss* (referentes ao primeiro experimento) como também animais *C57Black/6* selvagem e *knockout* para ON, INF- $\gamma$  e IL-10 (referentes ao segundo experimento) foram estudados.

A estirpe utilizada, denominada C57, foi isolada de um caprino naturalmente infectado e identificada através da cultura, biologia molecular e sorologia. Esta linhagem foi escolhida por apresentar uma alta capacidade proliferativa, *in vitro*, em comparação com outras linhagens presentes no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde, ICS-UFBA, e por ter sido recentemente obtida. Alguns estudos correlacionam a maior taxa de crescimento do microrganismo com uma maior virulência (DUNN & NORTH, 1995; WEST & BUCKLING, 2002; KANA et al., 2007). Em trabalhos utilizando 04 estirpes de *C. pseudotuberculosis* infectados em camundongos *C3H/HeJ* as estirpes de crescimento rápido promoviam uma maior disseminação e comprometimento de fígado, baço, pulmões e linfonodos mesentéricos apresentando áreas de inflamação mais intensas que as estirpes de crescimento lento (NIETO et al., 2009). Somando-se a isso, a escolha por utilizar uma linhagem recentemente isolada justifica-se pela observação que em microrganismos que são mantidos durante muito tempo em meios de cultura podem ser identificadas alterações em seus mecanismos de virulência, geralmente promovendo uma diminuição no seu potencial de estabelecer a doença (BICE & ZELEDON, 1970; BARTLEY et al., 2006).

A determinação da dose utilizada para a promoção da infecção,  $1 \times 10^2$  de C57 foi estabelecida com o objetivo de promover o desenvolvimento de uma patologia crônica, entretanto sem ocasionar mortalidade nos animais. A mortalidade precoce de camundongos infectados com linhagens virulentas de *C. pseudotuberculosis* foram relatadas em experimentos utilizando  $1 \times 10^6$  UFC (SIMMONS et al., 1997; PINHO et al., 2009). Além disso, em experimentos onde camundongos *CBA* foram infectados com  $1 \times 10^2$  UFC com linhagem virulenta deste microrganismo, e avaliados por 120 dias, apresentaram estabelecimento de resposta imune frente ao cocobacilo, com produção de anticorpos específicos e alterações na produção de citocinas como o INF- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\gamma$  (SOUZA, 2009; SILVA, 2010).

Sendo assim, o presente estudo objetivou caracterizar a infecção, por uma estirpe selvagem de *C. pseudotuberculosis*, em diferentes linhagens de camundongos, estabelecendo o perfil de susceptibilidade ou resistência destas linhagens, bem como a importância de determinados elementos da resposta imune frente a este patógeno. A importância deste estabelecimento se justifica uma vez que é relatada na literatura uma dicotomia entre a resposta imune estabelecida nos animais *Balb/c* quando comparado com os camundongos *C57Black/6*, com um perfil de resistência para este último, frente a diversos microrganismos como: *Brucella abortus* (MURPHY et al., 2001), *Yersinia enterocolitica* (AUTENRIETH et al., 1994); *Yersinia pseudotuberculosis* (TANSINI & MEDEIROS, 2009); *M. bovis* (WERNECK-BARROSO et al., 2000). Enquanto que os animais *Swiss*, por serem heterogênicos, se aproximam mais do perfil apresentado nos pequenos ruminantes, já que o estabelecimento de linhagens puras nestes animais é mais trabalhoso. Ademais, camundongos infectados com *C. pseudotuberculosis* apresentam sinais clínicos, perfil de hemograma e bioquímica sérica, bem como as alterações histopatológicas em órgãos viscerais similares aos observados em pequenos ruminantes tornando-se modelos importantes na compreensão da linfadenite caseosa (VALE, 2005; SOUZA, 2009; SILVA, 2010; JESSE, et al., 2011).

A avaliação morfológica, que corresponde a avaliação da formação de granulomas e o comprometimento do peso do baço, é uma ferramenta importante nesta comparação entre as linhagens, no entanto, todas as três linhagens avaliadas apresentaram o surgimento de granulomas, *Balb/c* com três e *C57Black/6* e *Swiss* com dois. O que foi identificado é que o surgimento dos granulomas nos animais *C57Black/6* foi protelado para 60 dias ao invés de 30 dias visto nas outras duas linhagens. Estes granulomas são observados principalmente nos linfonodos próximos da região de entrada do patógeno (WILLIAMSON, 2001; MEYER et al., 2005; FONTAINE, et al. 2006), cinco dos sete granulomas identificados neste experimento foram nos linfonodos. Não obstante, a bactéria pode utilizar tanto a via sanguínea, como a própria via linfática para se distribuir no organismo, livre ou no interior dos fagócitos, atingindo órgãos como pulmão, fígado e rins (BAIRD & FONTAINE et al., 2007; McKEAN et al., 2007; NIETO et al., 2009; JESSE et al., 2011). Por este motivo a avaliação da esplenomegalia foi realizada nestes animais, uma vez que, o comprometimento do baço poderia estar relacionado com esta disseminação (DUTTA et al., 2009; MATHURIN et al., 2009; DIAS et al., 2011; RODRIGUES-JUNIOR et al., 2012), contudo a análise realizada em cada grupo isoladamente não apresentou diferença estática significativa.

A contenção do microrganismo, após a entrada no organismo do animal, fica a cargo inicialmente dos neutrófilos e macrófagos e posteriormente o envolvimento de linfócitos. A eliminação fica baseada na eficácia de destruição das células fagocíticas, entretanto estes microrganismos, como vários outros intracelulares facultativos, conseguem sobreviver dentro destas células, com isso a formação de granulomas passa a ser uma alternativa para conter a disseminação, tanto nos pequenos ruminantes (PEPIN et al., 1992; PEPIN et al., 1994a; PEPIN et al., 1994b) como também em modelos murinos (JOLLY, 1965a; JOLLY, 1965b; LANN et al., 1998; LANN et al., 1999). Como a infecção foi realizada por via peritoneal, foi realizada a avaliação das células direcionadas para esta cavidade. Os animais *Balb/c* e *Swiss* apresentam um aumento logo ao sétimo dia após a infecção, que no *Balb/c* vai diminuindo nos dias subsequentes e torna a elevar com 120 dias e nos animais *Swiss* continua aumentando até 60º dia e diminui um pouco com 120 dias. Por sua vez, nos camundongos *C57Black/6* foi observado um aumento apenas no final da avaliação, com 60 e 120 dias.

A partir de então, foi realizado o diferencial celular para especificar quais seriam as alterações encontradas. Para os animais *Balb/c* os macrófagos apresentam um aumento com 07 e 30 dias, uma diminuição com 60 e voltam a aumentar com 120 dias, nos linfócitos ocorreu uma queda com 30 e 60 e volta a aumentar com 120 dias e para os neutrófilos ocorre um aumento com 07 dias que se mantém até o final da avaliação. Para os animais *C57Black/6* é possível identificar, nos macrófagos, um aumento com 07, seguido de uma queda com 30, seguido de uma elevação com 60 e 120 dias, os linfócitos apresentam uma queda com 07 e 30 dias e um aumento com 60 e 120 dias, e os neutrófilos é visto um aumento apenas com 07 e 30 dias. Já para os macrófagos dos animais *Swiss* é identificado um aumento gradual com pico aos 60 dias, para os linfócitos um aumento com 30, 60 e 120 dias, e os neutrófilos ocorre uma elevação com 07 seguido de uma pequena diminuição com 30 e o retorno para os valores basais acontecem a partir de 60 dias.

A diminuição no número de linfócitos encontrado durante a infecção com a linhagem *C57* poderia estar relacionada a uma maior produção de outras células plasmáticas, como os neutrófilos, que por sua vez estão aumentados nos animais *C57Black/6* nos mesmos intervalos onde foram identificadas estas diminuições. Esta diminuição de linfócitos na cavidade peritoneal também foi identificada após infecção com *Trypanosoma cruzi*, que foi relacionada a um direcionamento na produção de células plasmáticas ao invés das células B-1, que são encontradas principalmente nesta cavidade (MINOPRIO et al., 1989; MERINO et al., 2010). Além disso, Hedden e colaboradores (1986) analisaram a quantidade de linfócitos T e B, tanto

em cabras sadias quanto acometidas pela linfadenite caseosa e, observaram quantidades menores de linfócitos T nas cabras doentes, estes resultados corroboram com os aqui apresentados, uma vez que esta diminuição é observada na linhagem mais susceptível, *Balb/c*.

Ademais, é importante avaliar as características do local da infecção, a cavidade peritoneal, uma vez que Conlan & North, em 1994, relatam que a infecção por *Listeria monocytogenes* é exacerbada no fígado quando os neutrófilos são bloqueados por anticorpos RB6-8C5, fato este que não é visto nem no baço e nem na cavidade peritoneal, demonstrando assim que estas células podem ter importâncias diferentes a depender do local da infecção.

Por se tratar de um microrganismo intracelular facultativo, esta bactéria pode sobreviver dentro das células fagocíticas, e para que estas consigam eliminá-los, é importante o auxílio de citocinas pró-inflamatórias que estimulem a sua eficácia. Sendo assim, foi realizada a quantificação tanto de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-17 e Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos e Granulócitos - GM-CSF) como de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) em cultura de células peritoneais de animais *C57Black/6* estimuladas com antígeno secretado de *C. pseudotuberculosis*, e foi caracterizado o aumento estatisticamente significativo nas citocinas: IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e GM-CSF.

O TNF- $\alpha$  e a citocina IL-1 $\alpha$  atuam aumentando a permeabilidade vascular promovendo um recrutamento de células da resposta imune, além de promover a ativação destas células. O INF- $\gamma$  também atua promovendo a ativação principalmente os macrófagos induzindo a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos - MHC de classe I e II, sendo a sua produção estimulada principalmente pela IL-12 (NOLL, et al., 1996; PERRY et al, 1997; ALLIE et al., 2009; BRANDÃO et al, 2011; DIAS et al., 2011). Outra citocina pró-inflamatória importante é a IL-6, principalmente por estimular a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e estimular a produção de neutrófilos (APPELBERG et al., 1994; LEAL et al.,1999; DIAS et al., 2011). Enquanto que o GM-CSF, além de promover a maturação de células da medula óssea para aumentar a produção de leucócitos, pode atuar na ativação de neutrófilos e macrófagos (TANTAWICHIEEN, 1996).

Além da produção destas citocinas pró-inflamatórias foi possível observar também o aumento da IL-10, citocina considerada do perfil Th3 que tem uma ação anti-inflamatória promovendo uma inibição da produção de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-12, além de diminuir a expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas MHC da classe II nos macrófagos e células dendríticas, regulando a resposta imune (BOUSSIOTIS et al., 2000; DE LA

BARRERA et al., 2004; PINHO et al., 2009). Esta citocina pode ter contribuído para a formação dos granulomas registrados nestes animais, uma vez que regula a formação de fibrose, 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- $\gamma$  suprimindo a deposição de colágeno (WYNN, 2004). Além disso, foi relatada na literatura a produção desta citocina por macrófagos após exposição a componentes dos parasitas (POHL-KOPPE et al., 1998; TRINCHIERI, 2001).

A citocina IL-17 não foi produzida de forma detectável. Esta citocina poderia contribuir no controle de bactérias intracelulares por atuar no recrutamento de neutrófilos e de células T do perfil Th1 (KHADER et al., 2005; KHADER et al., 2007; UMEMURA et al., 2007; BAI et al., 2009). Outra citocina que não apresentou diferença estatística significativa foi a IL-2, que além da sua ação em estimular a proliferação dos linfócitos, atua aumentando a ação citolítica das células NK (LEAL et al., 1999; CREVEL et al., 2002).

O envolvimento das células T CD4<sup>+</sup>, principalmente envolvendo a subpopulação Th1, com a produção principalmente de INF- $\gamma$  e ativação de células fagocíticas, como também o envolvimento dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, envolvidos na produção de INF- $\gamma$  e também agindo na identificação e eliminação de células infectadas, são elementos indispensáveis na eliminação de microrganismos intracelulares (ZHAN & CHEERS, 1993; LAN et al., 1998; MURPHY et al., 2001; MACHADO et al., 2004; MATHURIN et al., 2009; BRANDÃO et al., 2012). Neste sentido, a avaliação da proporção de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, através da imunofenotipagem, como também a definição do grupo de citocinas produzidas no momento da eutanásia dos animais infectados com *C. pseudobercussis*, e assim definir a ou as subpopulações encontradas, torna-se um valioso instrumento.

A avaliação da intensidade de fluorescência das células T CD4<sup>+</sup> nos animais *Balb/c* revelaram uma constância destas células, ao passo que nos animais *C57Black/6* ocorre uma elevação aos 60 dias após a infecção, que também é visto nos camundongos *Swiss*, se mantendo elevado também aos 120 dias. Por outro lado, ao serem avaliados os linfócitos T CD8<sup>+</sup> é possível notar nos camundongos *Balb/c* uma diminuição aos 30 e 60 dias e em seguida um pico aos 120 dias, nos *C57Black/6* ocorre um aumento logo no sétimo dia, voltando aos valores bases com 30 e 60, e novo aumento é observado aos 120 dias; para os animais *Swiss* é identificado uma queda aos 07 e 30 dias seguidos de um aumento aos 60 e 120 dias.

Apenas os animais *C57Black/6* demonstram um aumento tanto de  $CD4^+$  quanto de  $CD8^+$  de forma mais efetiva, podendo contribuir na eliminação/contenção desta bactéria, uma vez que o aumento destas células em camundongos infectados com *Brucella abortus* são relacionadas a maior produção de citocina  $INF-\gamma$  como também maior identificação e eliminação de células infectadas, resposta esperada para microrganismos intracelulares facultativos (ARAYA et al., 1989; OLIVEIRA & SPLITTER, 1995). Ao passo que, a diminuição destas células, observadas tanto nos animais *Balb/c* quanto os animais *Swiss*, podem contribuir com a infecção, uma vez que a diminuição de células T  $CD8^+$  aumenta a sensibilidade de camundongos para a *Listeria monocytogenes* (EDELSON et al., 2011). Ademais, estudos utilizando macacos *rhesus* infectados com *Mycobacterium tuberculosis* ou imunizados com BCG objetivando avaliar a importância das células T  $CD8^+$  descreve que a ausência destas células promove uma diminuição importante da imunidade, e por este motivo, as avaliações sobre estas células devem ser incluídas em na busca de vacinas e imunoterapia mais eficientes (CHEN et al., 2009). Esta diminuição pode estar relacionada a uma fragilidade dos mecanismos de apresentação de antígenos para estas células, como visto com a *Salmonella enterica* (ALBAGHDADI et al., 2009).

Para contribuir com a definição do perfil celular estabelecido durante a infecção de *C. peseotuberculosis* durante a infecção em diferentes linhagens de camundongos foram mensuradas as produções das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27,  $INF-\gamma$  e TNF- $\alpha$ , no sobrenadante do homogenato do baço. O principal objetivo foi identificar quais eram as citocinas produzidas localmente (baço) e/ou de forma sistêmica no momento da eutanásia dos animais durante o percurso da infecção. Este procedimento já foi descrito, demonstrando variantes estatisticamente significativas, para a avaliação de citocinas do homogenato de baço (AUJLA et al., 2008; NEWSOM et al., 2011; GOEL & BHANAGAR, 2012; JIM et al., 2012; ZHU et al., 2012); cérebro (DATTA & OPP, 2008; TRIBOUILLARD-TANVIER et al., 2009; NEWSOM et al., 2011); linfonodo mesenquimal (NEWSOM et al., 2011) ou de pulmão (CAMPBELL et al., 2006).

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6,  $INF-\gamma$  e IL-17 foram agrupadas como citocinas pró-inflamatórias. Os animais *Balb/c* apresentaram uma elevação gradual da IL-1 $\alpha$ , enquanto que nos animais *C57Black/6* ocorre um aumento aos 07 e 30 dias, seguido de uma diminuição aos 60 dias e volta a aumentar aos 120 dias. Além da IL-1 $\alpha$  os animais *C57Black/6* aumentam a produção de  $INF-\gamma$  no início (07 dias) e no final (120 dias) da infecção, já nos camundongos da linhagem *Swiss* ocorreu uma queda na produção desta citocina aos 07 e 30 dias e aumenta

apenas aos 60 dias. Nos animais *Swiss* também é encontrado uma diminuição da produção de TNF- $\alpha$  aos 07 e 30 dias. Este panorama, com elevação de IL-1 $\alpha$  e de INF- $\gamma$  nos animais *C57Black/6* pode favorecer a eliminação do microrganismo nesta linhagem de camundongo, já que estas citocinas agem no recrutamento e ativação de células fagocíticas (NOLL, et al., 1996; PERRY et al, 1997; BRANDÃO et al, 2011), por outro lado demonstra maior sensibilidade dos animais *Swiss*, uma vez que é visto uma diminuição principalmente no início da infecção. A presença de IL-1 $\alpha$  nos animais *Balb/c* podem estar contribuindo com a formação dos granulomas identificados nesta linhagem, uma vez que foi descrito na literatura que está citocina poderia promover a indução da proliferação de fibroblastos, estimulando a deposição de colágeno, importantes na formação dos granulomas (LONNEMANN et al., 1995).

Para o grupo de citocinas relacionadas ao perfil Th3 (IL-10 e IL-13) e perfil Th2 (IL-4 e IL-5), é observada apenas um aumento aos 120 dias da citocina IL-13 nos animais *C57Black/6*. Esta citocina está diretamente relacionada com a resposta da subpopulação Th2, principalmente envolvida com resposta para helmintos (WYNN, 2003; PRICE et al, 2010), como ocorre o aumento apenas no final da infecção este fato pode indicar um envolvimento da resposta Th2 que, por sua vez, contribui para a formação de granulomas através do estímulo para a produção de fibrinogênio e fatores de crescimento de tecido conectivo (REIMAN et al., 2006; LIU et al., 2012). McFarlane e colaboradores (2011) trabalhando com animais *Balb/c knockout* para a IL-13 aponta a importância e o papel benéfico desta citocina na formação de granulomas contra a leishmaniose, patógeno intracelular, e contribuindo para diminuir a presença deste protozoário no baço e na medula óssea, estes dados também foram observados por Murray e colaboradores (2006). Como esta linhagem vem demonstrando ser mais resistente a este microrganismo esta citocina pode contribuir de forma efetiva no perfil da resposta montada.

Embora ocorra a produção de IL-13 nos animais *C57Black/6* possibilitando o direcionamento para um perfil Th2 mais para o final da infecção, também foi identificado um aumento da produção de IL-27 aos 120 dias, e da citocina IL-22 aos 60 e 120 dias. Estas citocinas são importantes para o estabelecimento de um perfil Th1, já que a IL-27 pode agir de forma sinérgica a IL-12 e a IL-22, além de inibir a produção de IL-4 (WOLK et al., 2002; LUCAS et al., 2003; KAWAKAMI et al., 2004; VILLARINO et al., 2006; GROOT et al., 2012). Nos animais *Swiss* é observado aumento das citocinas IL-2 e IL-27 aos 60 e 120 dias. A IL-2 também está aumentada nos animais *Balb/c* a partir de 30 dias. Este contexto, com

aumento de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-22 e IL-27 sugeri que os animais *C57Black/6* estabelecem uma resposta do tipo Th1, que por sua vez, pode contribuir para a maior resistência desta linhagem a infecções com *C. pseudotuberculosis*.

A geração de camundongos *knockout*, através da deleção de um gene de interesse, cada vez mais vem sendo aplicado com a finalidade de implementar a compreensão a respeito do envolvimento de determinados elementos da resposta imune frente a diversas infecções. Neste sentido, o presente trabalho utilizou desta ferramenta para demonstrar a importância/envolvimento do óxido nítrico, INF- $\gamma$  e da citocina IL-10 no processo de eliminação ou estabelecimento da infecção por *C. pseudotuberculosis*.

A infecção com microrganismos intracelulares em animais *knockout* para diversas citocinas relacionadas com uma resposta celular, que promova a ativação de células fagocíticas, ocasiona uma precocidade nos óbitos destes animais (MAHON et al., 1997; BEAN et al., 1999; ROACH, et al., 2001; ALLIE, et al., 2010; BRANDÃO et al., 2012), entretanto, estes resultados não foram identificados neste trabalho, provavelmente devido à dose utilizada e ao intervalo da análise estabelecido, uma vez que animais *knockout* para ON infectados com  $1 \times 10^7$  de *C. pseudotuberculosis* apresentaram uma mortalidade elevada (primeiro manuscrito/capítulo produzido nesta tese). Em relação ao intervalo analisado, Brandão e colaboradores (2012) relata óbito a partir do 16<sup>o</sup> de infecção com  $10^6$  UFC de *Brucella abortus* em animais *knockout* para o INF- $\gamma$ , como o intervalo pesquisado neste trabalho foi melhor, 14 dias, é possível que a avaliação onde possa ser empregado um intervalo maior revelaria estas perdas.

Além disso, não foi relatado alterações morfológicas significativas nestes animais, uma vez que foi observado a formação de apenas um granuloma em linfonodo em um animal *C57Black/6-KO-ON* e nenhuma alteração em relação ao peso do baço, que revelaria uma esplenomegalia. Estes resultados eram esperados para os animais KO-IL-10, uma vez que, macrófagos dos animais *knockout* para esta citocina produzem mais IL-12 (NARUSE et al, 2011), além de aumentar a produção de INF- $\gamma$ , correlacionado com o perfil Th1, como também consegui eliminar de forma mais eficiente microrganismos intracelulares, sem a necessidade da formação de granulomas (YANG et al, 1999; SHIBATA et al., 2001).

Ao avaliar o direcionamento celular para o local da infecção foi observado um aumento nos animais KO-INF- $\gamma$ . No diferencial celular é identificada uma elevação nos

neutrófilos em todas as linhagens de camundongos estudadas, e apenas para os animais KO-INF- $\gamma$  um aumento, também, nos linfócitos. Este fato é similar ao encontrado na literatura durante a infecção de *M. tuberculosis* em animais *knockout* para TNF que revela um infiltrado neutrofilico intenso (BEAN, et al., 1999).

Embora a estimulação pelos antígenos secretados da bactéria tenha promovido a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e da IL-10, *in vitro*, ao se avaliar a produção destas mesmas citocinas em cultura na presença da bactéria viável (na proporção de 1:5), nos animais *C57Black/6* selvagem e *knockout*, não foi observado resultados similares. Apenas ocorreu uma produção estatisticamente significativa para as citocinas TNF- $\alpha$  nos animais selvagens, KO-INF $\gamma$  e KO-IL-10; a citocina GM-CSF para KO-IL-10 e da citocina IL-17 para os animais KO-ON. O intuito deste ensaio estava relacionado com a avaliação da capacidade que antígenos presentes na parede bacteriana teriam em estimular ou inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, os resultados aqui apresentados, referidos a não produção destas citocinas de forma mais representativa, poderia estar relacionado com as características dos antígenos somáticos de *C. pseudotuberculosis*, em inibir uma resposta imune, principalmente por diminuir a produção de INF- $\gamma$  e estimular a produção da citocina IL-10 (REGIS, 2001; MEYER et al., 2005; SILVA, 2010).

A avaliação da fagocitose e/ou invasão pela bactéria foi avaliada através da visualização deste microrganismo dentro das células, uma vez que foi relatado que, além da realização da fagocitose por células fagocíticas, a *C. pseudotuberculosis* pode aderir e invadir células não fagocíticas, e desta forma, atuar na manutenção deste microrganismo no hospedeiro (VALDIVIA et al., 2012).

No tocante a avaliação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, é possível notar que ocorre uma diminuição no 14º dia de infecção para as células T CD4<sup>+</sup> nos animais *C57Black/6*-KO-INF- $\gamma$  e KO-ON, enquanto que para os animais KO-IL-10 é visto uma diminuição no sétimo dia, entretanto é percebido um retorno aos valores basais no 14º dia. Para as células T CD8<sup>+</sup>, ocorre um aumento de forma gradual nos animais KO-ON e nos animais KO-IL-10 este aumento ocorre apenas no sétimo dia. Como a resposta imune esperada contra patógenos intracelulares facultativos envolvem as células T CD4<sup>+</sup>, da Subpopulação Th1, que tem no INF- $\gamma$  a sua principal ferramenta, que por sua vez, também será produzido por células T CD8<sup>+</sup> (ZHAN & CHEERS, 1993; LAN et al., 1998; MURPHY et al., 2001; MACHADO et al., 2004; MATHURIN et al., 2009; BRANDÃO et al., 2012) a ausência desta citocina poderia

estar relacionado com esta diminuição nos animais KO-INF- $\gamma$ . Entretanto, estes resultados encontrados nos animais KO-IL-10 divergem da literatura, uma vez que, animais *knockout* para esta citocina, quando infectados com *Chlamydia trachomatis* apresentaram maiores produções de células T CD4<sup>+</sup> (YANG et al, 1999).

Na avaliação da produção de citocinas produzidas no homogenato do baço foi observada a produção da citocina IL-1 $\alpha$  produzida no início da infecção (07° dia) nos animais KO-INF- $\gamma$ . A elevação da IL-1 $\alpha$  pode estar correlacionada com uma tentativa de ativar mais células fagocíticas, uma vez que as células presentes no sítio da infecção demonstram uma dificuldade em eliminar os microrganismos, uma vez que estes animais não produzem INF- $\gamma$ .

Entretanto, a maioria das citocinas aqui analisada apresentaram valores muito baixos, não sendo possível caracterizar a dinâmica das produções durante a infecção com *C. pseudotuberculosis*, na verdade, a avaliação utilizando outro protocolo, como por exemplo, a mensuração em sobrenadante de cultura, deve ser apreciado para melhor compreender/relacionar o papel destas citocinas no percurso da infecção em animais *knockout* para ON, INF- $\gamma$  e IL-10, uma vez que foi quantificado valores mais expressivos na cultura com antígenos secretados da bactéria do que no homogenato do baço em algumas delas.

Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão do tipo de resposta, e dos mecanismos imunológicos envolvidos durante infecção com estirpe selvagem de *C. pseudotuberculosis* nas diferentes linhagens de camundongos, com isso, fortalecendo os conhecimentos da relação *parasito-hospedeiro*, cruciais para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas e na busca de uma vacina eficaz frente a este microrganismo. Assim, os animais *C57Black/6* apresentaram um direcionamento celular para o local da infecção, como também a produção de citocinas por células fagocíticas compatíveis com uma atuação bem sucedida frente a infecções por microrganismos intracelulares facultativos e apresentaram uma tendência em estabelecer uma resposta do tipo Th1, com produção de INF- $\gamma$ , IL-22 e IL-27. Por outro lado, os animais *Balb/c* e *Swiss* demonstraram ser mais susceptíveis a infecção, principalmente por apresentarem uma diminuição das células T durante o percurso da infecção apresentando uma dificuldade na produção de citocinas relacionadas ao perfil Th1, tão importantes para enfrentar de forma efetiva este microrganismo, além de apresentar a formação de granulomas de forma mais precoce, quando comparadas a linhagem *C57Black/6*.

## **Agradecimentos**

Este estudo teve apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), da Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAPEX) e do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Tabela 01 Quantidade (positivo/avaliado) de animais *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*, com presença de granulomas por grupo analisado.

Tempo	Balb/c Cont.	Balb/c C57	C57black/6 Cont.	C57black/6 C57	Swiss Cont.	Swiss C57
07 dias	00/02	00/05	00/02	00/05	00/02	00/05
30 dias	00/02	03/05	00/02	00/05	00/02	01/05
60 dias	00/02	00/05	00/02	02/05	00/02	01/05
120 dias	00/02	00/05	00/02	00/05	00/02	00/04
Total	00/08	03/20	00/08	02/20	00/08	02/19

Tabela 02. Principais regiões anatômicas acometidas com granulomas nos animais *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*.

Região Anatômica	Balb/c Cont.	Balb/c C57	C57black/6 Cont.	C57black/6 TC57	Swiss Cont.	Swiss C57
Linfonodo	00	02	00	01	00	02
Rim	00	01	00	01	00	00
Total	00	03	00	02	00	02

Tabela 03 Quantidade (positivo/avaliado) de animais *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$* , *C57Black/6-KO-IL-10* com presença de granulomas por grupo analisado.

Tempo	Selv. Cont.	Selv. C57	KO-ON Cont.	KO-ON C57	KO-IFN Cont.	KO-IFN C57	KO-IL-10 Cont	KO-IL-10 C57
07 dias	00/02	00/05	00/02	01/05	00/02	00/05	00/02	00/05
14 dias	00/02	00/05	00/02	00/05	00/02	00/05	00/02	00/05
Total	00/04	00/10	00/04	01/10	00/04	00/10	00/04	00/010

Tabela 04. Principais regiões anatômicas acometidas com granulomas nos animais *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$* , *C57Black/6-KO-IL-10*.

Região Anatômica	Selv. Cont.	Selv. C57	KO-ON Cont.	KO-ON C57	KO-IFN Cont.	KO-IFN C57	KO-IL-10 Cont	KO-IL-10 C57
Linfonodo	00	00	00	01	00	00	00	00
Total	00	00	00	01	00	00	00	00

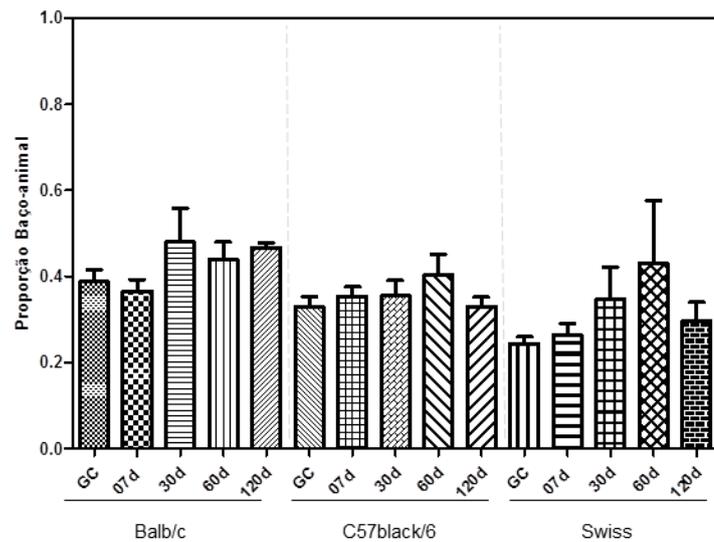


Figura 01 – Determinação do peso do baço de camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/\text{ml}$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde o peso corporal, seguido pelo do baço, foram obtidos. A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa individualmente. Entretanto ao se comparar a relação entre as três linhagens, em cada dia avaliado, foi possível observa uma diferença estatisticamente significativa para o ponto 07d ( $p = 0,0308$ ), onde:  $Balb/c = C57Black/6 > Swiss$  e para o ponto 120d ( $p = 0,0106$ ), apresentando a relação:  $Balb/c > C57Black/6 = Swiss$ .

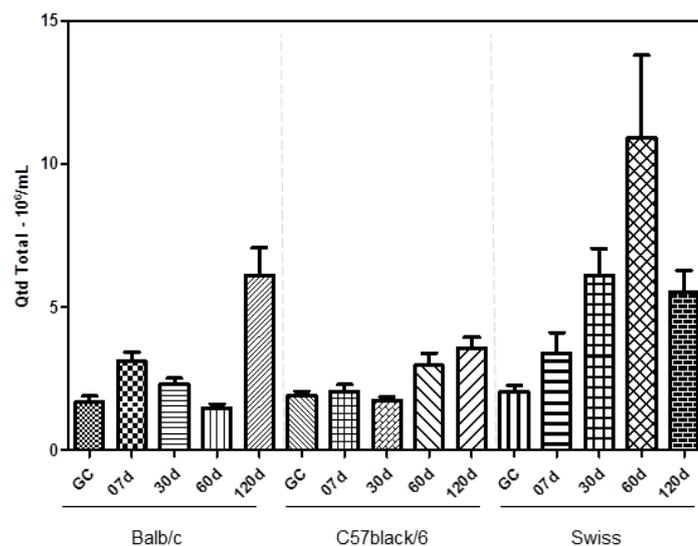


Figura 02 – Determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/\text{ml}$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde foi realizada a quantificação total de células presentes na cavidade peritoneal através de um contador automático de células. A comparação entre os

grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identifica uma diferença estatística significativa nos animais **Balb/c** ( $p = 0,0003$ ), onde:  $120\text{ d} > 07\text{ d} > 30\text{ d} > 60\text{ d} = \text{GC}$ . Já para os animais **C57Black/6** ( $p = 0,0032$ ), e a seguinte relação:  $120\text{ d} > 60\text{ d} > 30\text{ d} = 07\text{ d} = \text{GC}$ ; e para os animais **Swiss** ( $p = 0,0015$ ), revelando no pós-teste que:  $60\text{ d} > 07\text{ d} = 30\text{ d} = 120\text{ d} > \text{GC}$ .

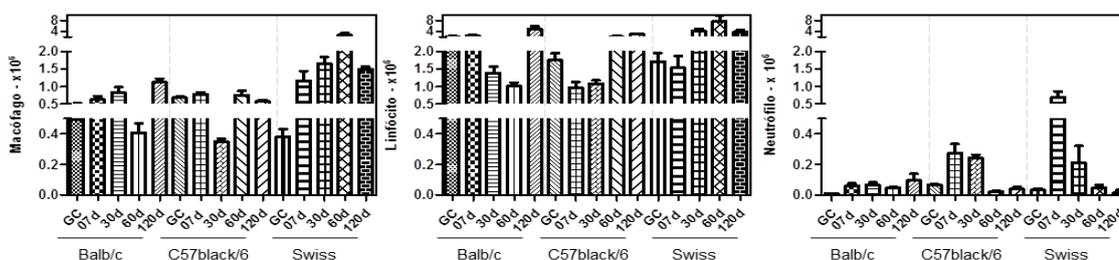


Figura 03 – Determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos **Balb/c**, **C57Black/6** e **Swiss**. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/\text{ml}$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde foi realizada a avaliação através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes valores para a linhagem **Balb/c**: *Macrófagos* ( $p = 0,0024$ ), tendo a relação:  $120\text{ d} > 07\text{ d} = 30\text{ d} > \text{GC} = 60\text{ d}$ ; *Linfócitos* ( $p = 0,0004$ ), apresentando:  $120\text{ d} > \text{GC} = 07\text{ d} > 30\text{ d} = 60\text{ d}$  e *Neutrófilos* ( $p = 0,0117$ ), onde:  $\text{GC} < 07\text{ d} = 30\text{ d} = 60\text{ d} = 120\text{ d}$ . Para os animais da linhagem **C57Black/6**, os *Macrófagos* ( $p = 0,0086$ ), apresentando:  $07\text{ d} = 120\text{ d} > \text{GC} = 30\text{ d}$ ; os *Linfócitos* ( $p = 0,0005$ ), e relação:  $120\text{ d} = 60\text{ d} > 07\text{ d} = 30\text{ d}$ ,  $120\text{ d} > \text{GC}$  e os *Neutrófilos* ( $p = 0,0001$ ), e pós-teste:  $07\text{ d} = 30\text{ d} > 60\text{ d} = 120\text{ d}$ . Já a linhagem **Swiss** os *Macrófagos* ( $p = 0,0015$ ), pós-teste:  $\text{GC} = 07\text{ d} = 120\text{ d} = 30\text{ d} > 60\text{ d}$ ; os *Linfócitos* ( $p = 0,0024$ ), pós-teste:  $30\text{ d} = 60\text{ d} = 120\text{ d} > \text{GC} = 07\text{ d}$  e os *Neutrófilos* ( $p = 0,0024$ ), apresentando no pós-teste:  $07\text{ d} > \text{GC} = 60\text{ d} = 120\text{ d}$ ,  $30\text{ d} > \text{GC}$ .

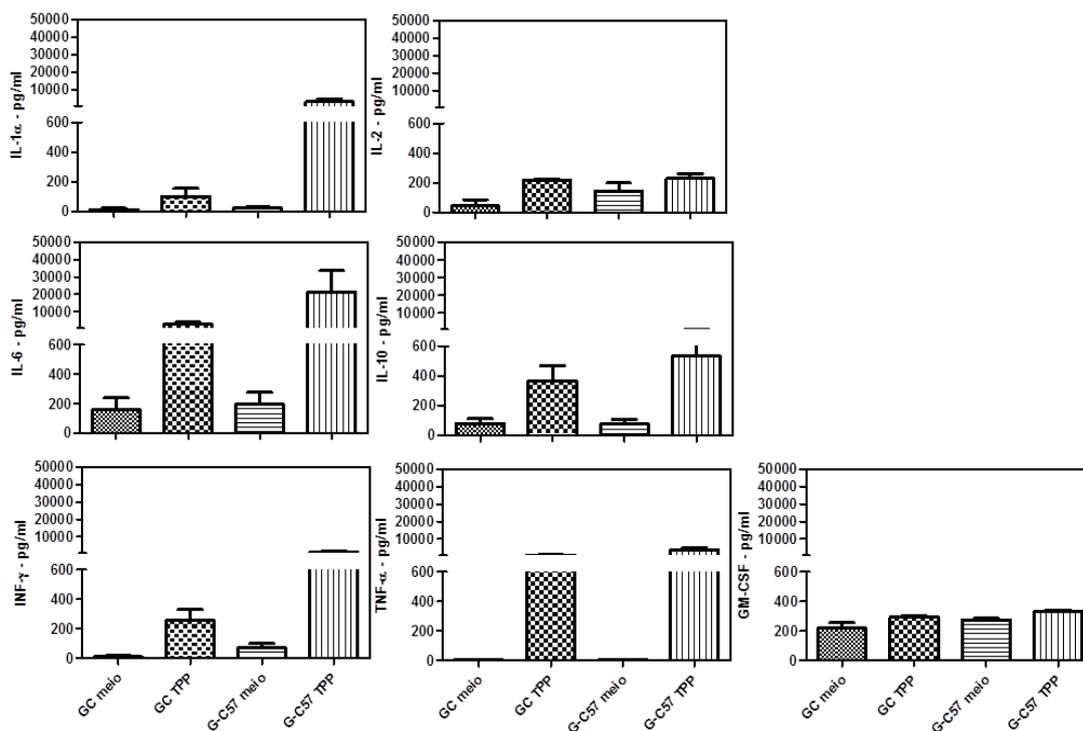


Figura 04 – Determinação da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GM-CSF, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 por células aderentes dos animais C57Black/6 estimuladas com antígeno secretado da bactéria T1 (TPP). Os camundongos C57Black/6 foram injetados com salina (grupo controle) ou infectados com  $10^2$ /ml da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis* (grupo teste) por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 14 dias, onde as células peritoneais, tanto do grupo controle (GC), quanto do grupo teste (G-T1) foram cultivadas na presença de apenas meio RPMI ou de 40 $\mu$ g/mL de TPP durante 24h. A quantificação foi realizada no sobrenadante de cultura utilizando citometria de fluxo. É possível observar uma diferença estatística, através do teste de Kruskal-Wallis, na produção das seguintes citocinas: **IL-1 $\alpha$**  ( $p = 0,0070$ ), e o pós-teste realizado pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney, entre as células que receberam apenas meio com as que foram estimuladas com os antígenos da T1, no grupo teste possui  $p = 0,0079$ ; **IL-6** ( $p = 0,0443$ ) com pós-teste para o grupo teste com  $p = 0,0362$ ; **IL-10** ( $p = 0,0048$ ) no grupo controle possuem um  $p = 0,0286$  e no grupo teste  $p = 0,0119$ ; **INF- $\gamma$**  ( $p = 0,0122$ ) e pós-teste para o grupo teste com  $p = 0,0273$  e para a citocina **GM-CSF** ( $p = 0,0096$ ) e pós-teste para o grupo teste com  $p = 0,0119$ . Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas citocinas **IL-2**, **TNF- $\alpha$**  e **IL-17**.

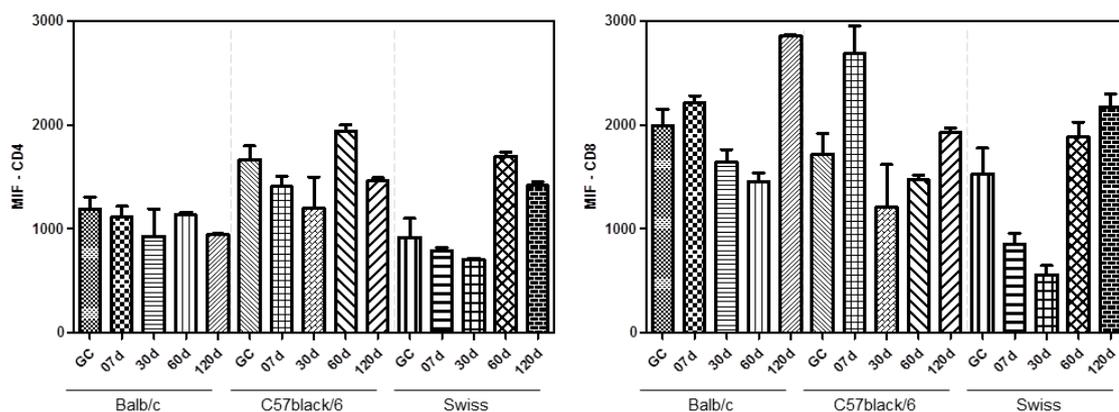


Figura 05 – Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/ml$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes valores para o MIF de  $CD4^+$ , os animais *C57Black/6* ( $p = 0,0456$ ), com a seguinte relação:  $60\text{ d} > 120\text{ d} = 07\text{ d}$ , pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney. Os animais *Swiss* ( $p = 0,0059$ ), e pós-teste revelando que:  $60\text{ d} = 120\text{ d} > 07\text{ d} = 30\text{ d}$ ,  $60\text{ d} > GC$ . Para o MIF de  $CD8$  foi possível detectar uma diferença estatística significativa nos animais *Balb/c* ( $p = 0,0033$ ), e pós-teste:  $120\text{ d} > GC = 07\text{ d} < 30\text{ d} = 60\text{ d}$ , nos animais *C57Black/6* ( $p = 0,0096$ ) e pós-teste:  $07\text{ d} > GC$ ,  $60\text{ d}$ ,  $120\text{ d}$ ,  $120\text{ d} > 60\text{ d}$ , e para o grupo *Swiss* ( $p = 0,0029$ ), onde  $GC = 60\text{ d} = 120\text{ d} > 30\text{ d} = 60\text{ d}$ .

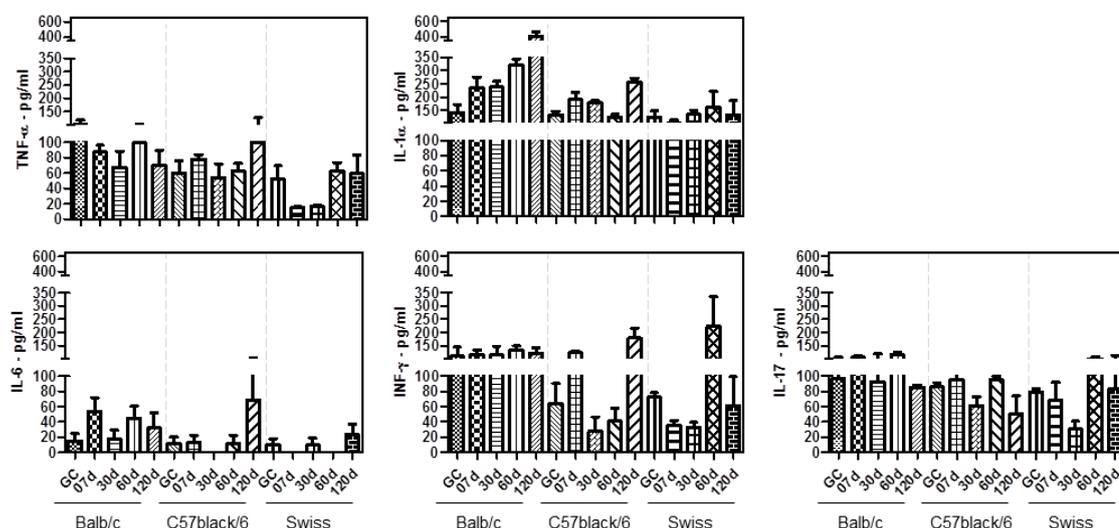


Figura 06 – Determinação da produção das citocinas  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $INF-\gamma$  e  $IL-17$  no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/ml$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas para a citocina **IL-1 $\alpha$** , no grupo *Balb/c* ( $p = 0,0022$ ), tendo como relação:  $120\text{ d} = 60\text{ d} > 30\text{ d} = 07\text{ d} > GC$ ; e para os animais *C57Black/6* ( $p = 0,0021$ ), apresentando na relação:  $120 > 60\text{ d} = GC < 07\text{ d} = 30\text{ d}$ . Já o **TNF- $\alpha$**  do grupo *Swiss* ( $p = 0,0208$ ), onde o  $GC = 60\text{ d} > 07\text{ d} = 30\text{ d}$  e para esta mesma linhagem o

**INF- $\gamma$**  ( $p = 0,0062$ ), com pós-teste:  $60 \text{ d} > \text{GC} > 07 \text{ d} = 30 \text{ d}$ . Não foi possível detectar diferenças para **IL-6** e **IL-17**.

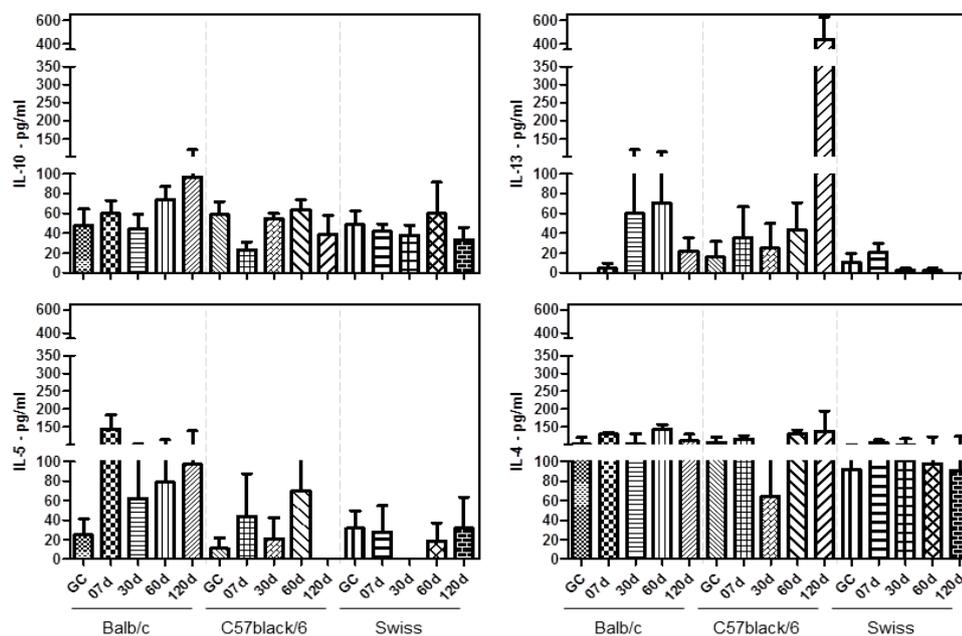


Figura 07 – Determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/\text{ml}$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas para a citocina **IL-13**, no grupo *C57Black/6* ( $p = 0,0391$ ), apresentando no pós-teste:  $120 \text{ d} > 30 \text{ d} = 60 \text{ d} = 07 \text{ d} = \text{GC}$  e não foram observadas alterações nas citocinas IL-10, IL-5 e IL-4.

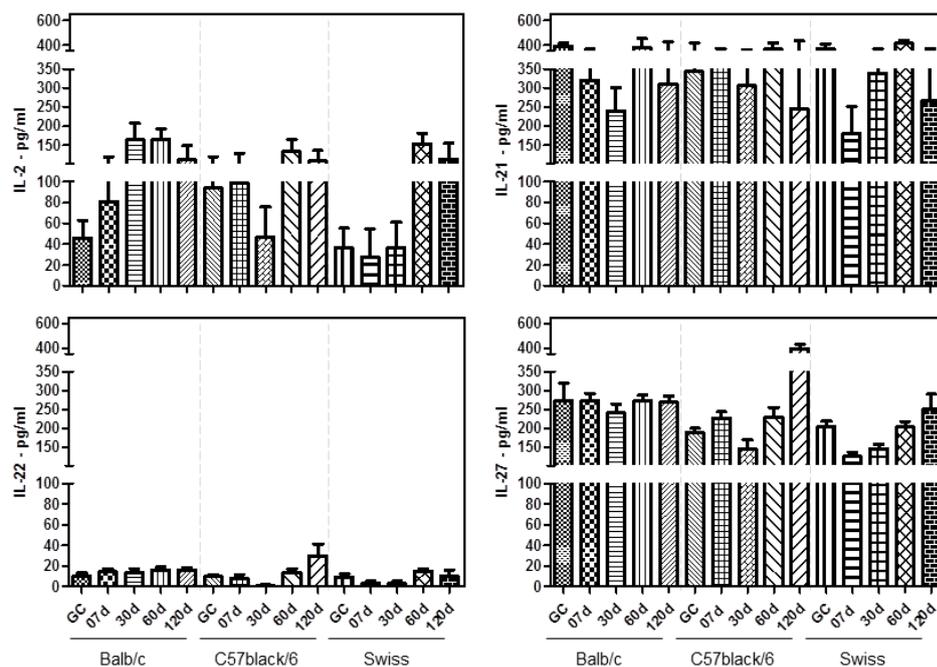


Figura 08 – Determinação da produção das citocinas IL-02, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2$ /ml da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas para a citocina **IL-2** nos animais *Balb/c* ( $p = 0,0450$ ), tendo a seguinte relação: 30 d = 60 d > GC; para os animais *Swiss* ( $p = 0,0379$ ), pós-teste: 60 d = 120 d > GC = 07 d = 30 d. Para a **IL-22** no grupo *C57Black/6* ( $p = 0,0235$ ), pós-teste: 120 d = 60 d > GC = 07 d > 30 d. Para a citocina **IL-27** nos animais *C57Black/6* ( $p = 0,0023$ ), pós-teste: 120 d > GC = 07 d = 30 d = 60 d; para o grupo *Swiss* ( $p = 0,0039$ ), pós-teste: 60 d = 120 d > GC = 07 d = 30 d. Não foi detectada mudanças estatisticamente significativas na produção de **IL-21**.

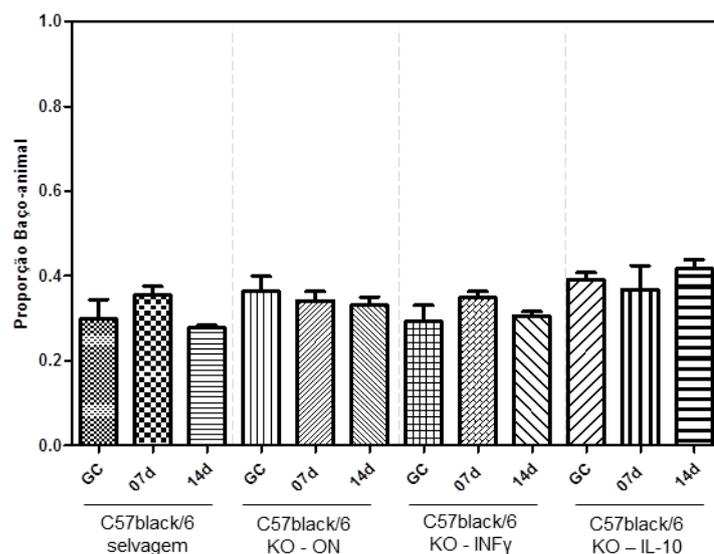


Figura 09 – Determinação do peso do baço de camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6*-KO-ON, *C57Black/6*-KO-INF- $\gamma$  e *C57Black/6*-KO-IL-10. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2$ /ml da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde o peso corporal, seguido pelo do baço, foram obtidos. A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, e apenas os animais *C57Black/6* selvagem ( $p=0,0477$ ), revelando uma relação onde o 07 d > 14 d.

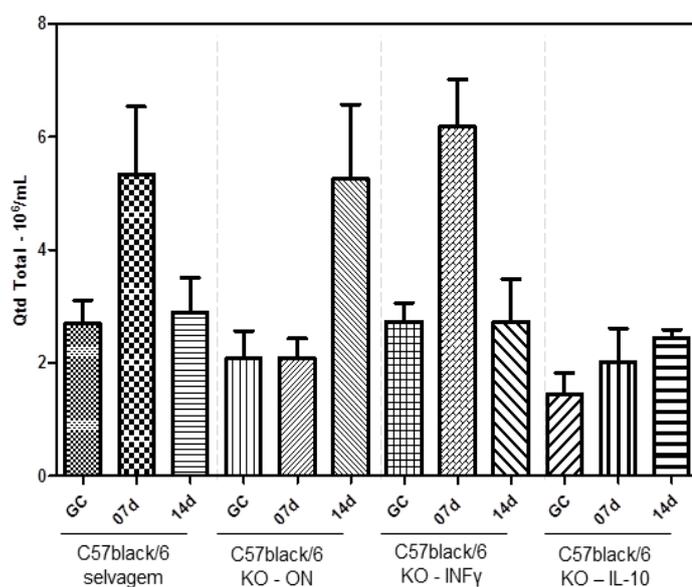


Figura 10 – Determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6*-KO-ON, *C57Black/6*-KO-INF- $\gamma$  e *C57Black/6*-KO-IL-10. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2$ /ml da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde foi realizada a quantificação total de células presentes na cavidade peritoneal através de um contador automático de células. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde os

animais *C57Black/6-OK- $\text{INF}\gamma$*  ( $p = 0,0164$ ), e na avaliação pós-teste revelou a seguinte relação: 07 d > 14 d = GC.

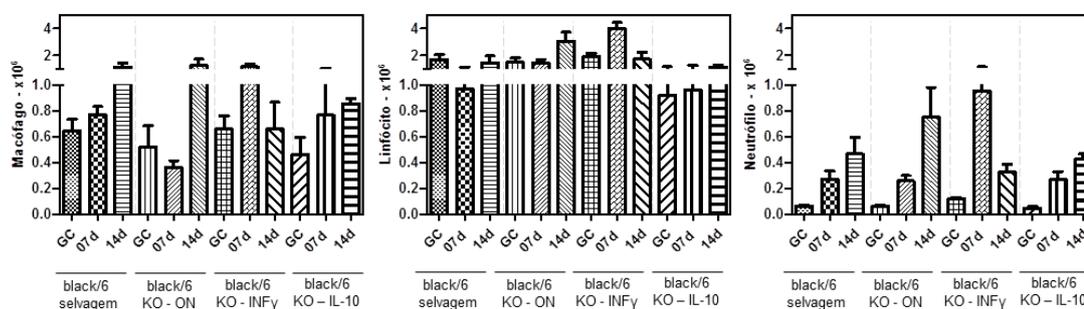


Figura 11 – Determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO- $\text{INF}\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/\text{ml}$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde foi realizada a avaliação através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes achados: ***C57Black/6 selvagem*** com *neutrófilos* ( $p = 0,0113$ ) onde 14 d = 07 d > GC; o grupo ***C57Black/6-OK-ON*** com os *neutrófilos* ( $p = 0,0096$ ) com 14 d = 07 d > GC; os ***C57Black/6-OK- $\text{INF}\gamma$***  para os *linfócitos* ( $p = 0,0159$ ) onde 07 d > 14 d = GC, e os *neutrófilos* ( $p = 0,0040$ ) e o pós-teste: 07 d > 14 d > GC; para o grupo ***C57Black/6-OK-IL-10*** os *neutrófilos* ( $p = 0,0096$ ), tendo o 14 d = 07 d > GC.

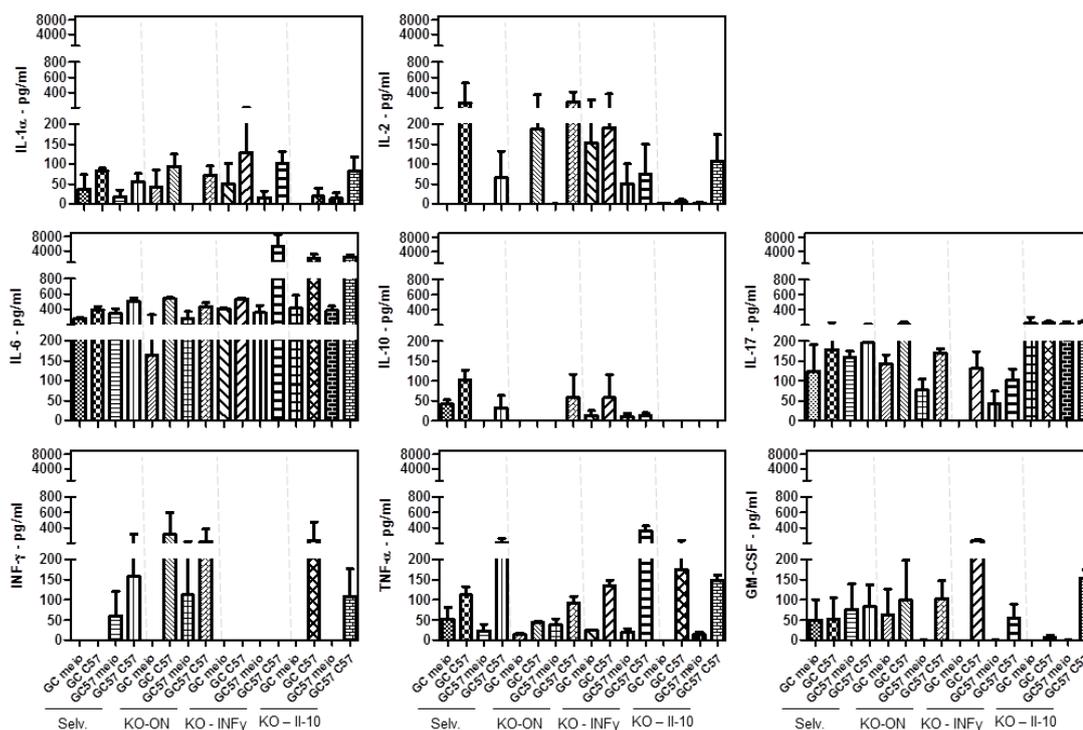


Figura 12 – Determinação da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 por células aderentes dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10* estimuladas com *C. pseudotuberculosis* viva. Os camundongos *C57Black/6* foram injetados com salina (grupo controle) ou infectados com  $10^2$ /ml da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis* (grupo teste) por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 14 dias, onde as células peritoneais, tanto do grupo controle (GC), quanto do grupo teste (GT1), de cada linhagem estudada, foram cultivadas na presença de apenas meio RPMI ou de *C. pseudotuberculosis* viva (TC57), na proporção de (1:5), por 01h30 min. A quantificação foi realizada no sobrenadante de cultura utilizando citometria de fluxo. É possível observar uma diferença estatística significativa, através do teste de Kruskal-Wallis, na produção das seguintes citocinas: **TNF- $\alpha$**  nos animais *C57Black/6 selvagem* ( $p = 0,0298$ ) e pós-teste no grupo teste com  $p = 0,0294$ , para o grupo *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  ( $p = 0,0125$ ) com pós-teste no grupo controle com  $p = 0,0138$ , e para o grupo teste de  $p = 0,0119$  e para os animais *C57Black/6-KO-IL-10* ( $p = 0,0156$ ), com pós-teste para o grupo teste de  $p = 0,0119$ . A produção da citocina **IL-6** nos animais *C57Black/6-KO-IL-10* ( $p = 0,0271$ ) e pós-teste no grupo teste de  $p = 0,0119$ . Para a produção da citocina **GM-CSF** nos animais *C57Black/6-KO-IL-10* ( $p = 0,0171$ ) no grupo teste, com  $p = 0,0097$  e para a citocina **IL-17** no grupo *C57Black/6-KO-ON* ( $p = 0,0262$ ), tendo no pós-teste, para o grupo teste de  $p = 0,0159$ . Não foi observada uma diferença estatística significativa ao se analisar as citocinas: **IL-1 $\alpha$** , **INF- $\gamma$** , **IL-10** e **IL-2**.

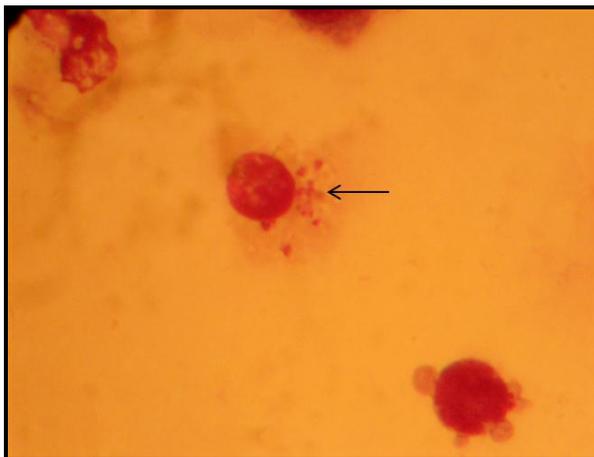


Figura 13 – Célula aderente de camundongo *C57Black/6* selvagem estimulada com *C. pseudotuberculosis* viva (C57). Os camundongos *C57Black/6* foram injetados com salina (grupo controle) ou infectados com  $10^2$ /ml da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis* (grupo teste), por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 14 dias, onde as células peritoneais, tanto do grupo controle (GC), quanto do grupo teste (GC571) foram cultivadas na presença de apenas meio RPMI ou de *C. pseudotuberculosis* viva, na proporção de (1:5), por 01h30 min. A seta indica presença da bactéria internalizada.

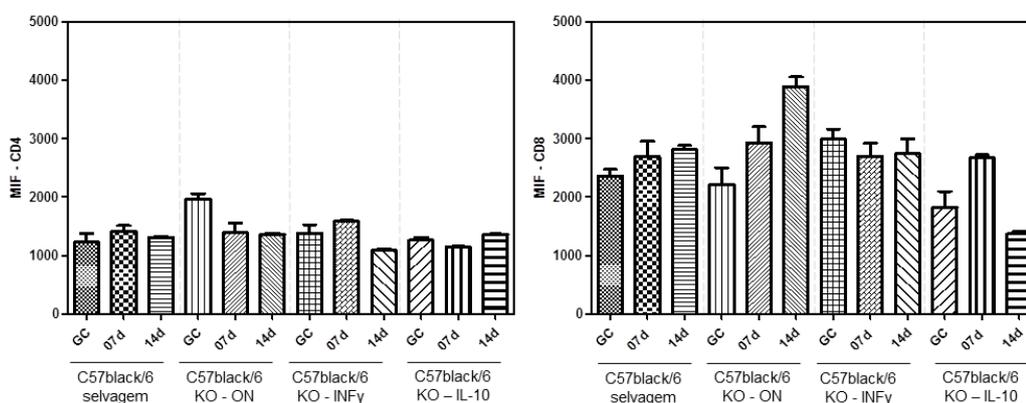


Figura 14 – Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6*-KO-ON, *C57Black/6*-KO-INF- $\gamma$  e *C57Black/6*-KO-IL-10. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2$ /ml da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes valores para o MIF de CD4<sup>+</sup>, no grupo **C57Black/6-KO-ON** ( $p = 0,0365$ ) tendo o GC >14 d; para os animais **C57Black/6-KO-INF- $\gamma$**  ( $p = 0,0286$ ), onde GC = 07 d > 14 d e para os animais **C57Black/6-KO-IL-10** ( $p = 0,0079$ ), revelando que 07 d < 14 d = GC. O MIF para CD8<sup>+</sup> no grupo **C57Black/6-KO-ON** ( $p = 0,0107$ ), onde 14 d > 07 d = GC; para os animais **C57Black/6-KO-IL-10** ( $p = 0,0099$ ), e análise pós-teste: 07 d > 14 d = GC.

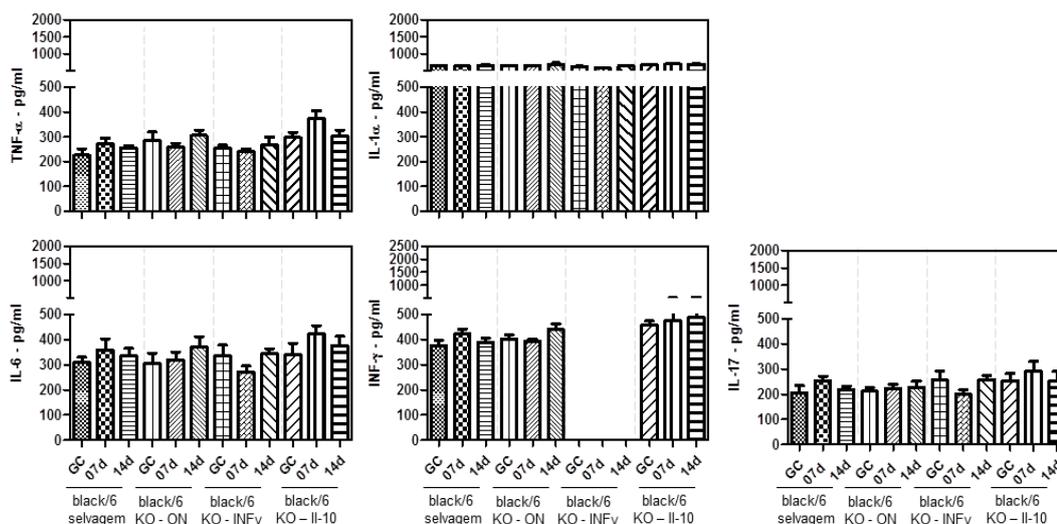


Figura 15 – Determinação da produção das citocinas  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{INF-}\gamma$  e  $\text{IL-17}$  no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/\text{ml}$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07 e 14 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas da citocina **IL-1 $\alpha$** , para os animais *C57Black/6-KO-INF $\gamma$*  ( $p = 0,0140$ ), revelando que 07 d > 14 d = GC. Não foi realizada a quantificação da citocina  $\text{INF-}\gamma$  nos animais *C57Black/6-KO-INF $\gamma$* . Não foi possível detectar diferenças estatísticas significativas para **TNF- $\alpha$** , **IL-6**, **INF- $\gamma$**  e **IL-17**.

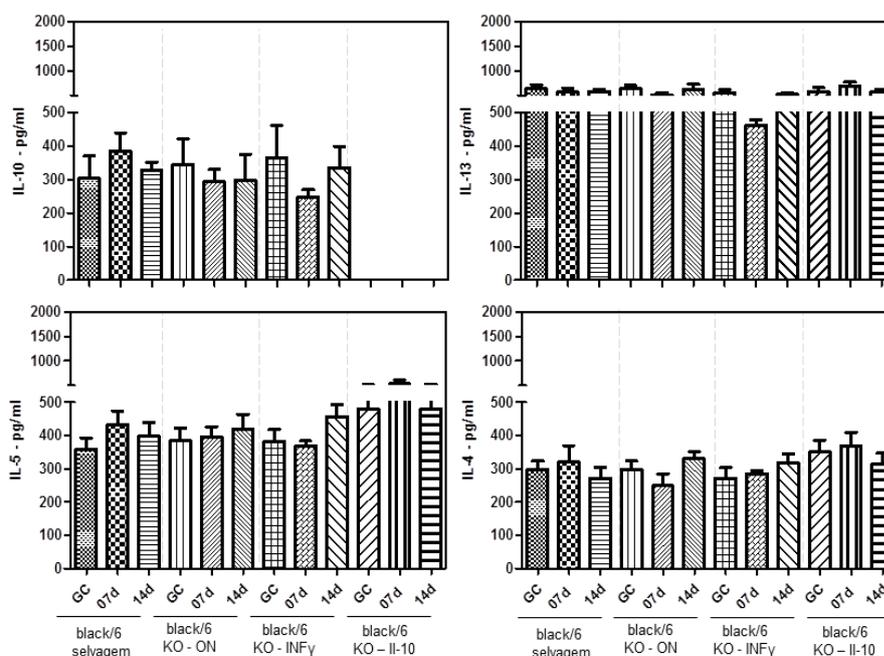


Figura 16 – Determinação da produção das citocinas  $\text{IL-10}$ ,  $\text{IL-13}$ ,  $\text{IL-5}$  e  $\text{IL-4}$  no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2/\text{ml}$  da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais

foram avaliados após 07 e 14 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde não foi possível identificar uma diferença estatística significativa para nenhuma citocina em nenhum grupo estudado. Não foi realizada a quantificação da citocina IL-10 para os animais *C57Black/6-KO-IL-10*.

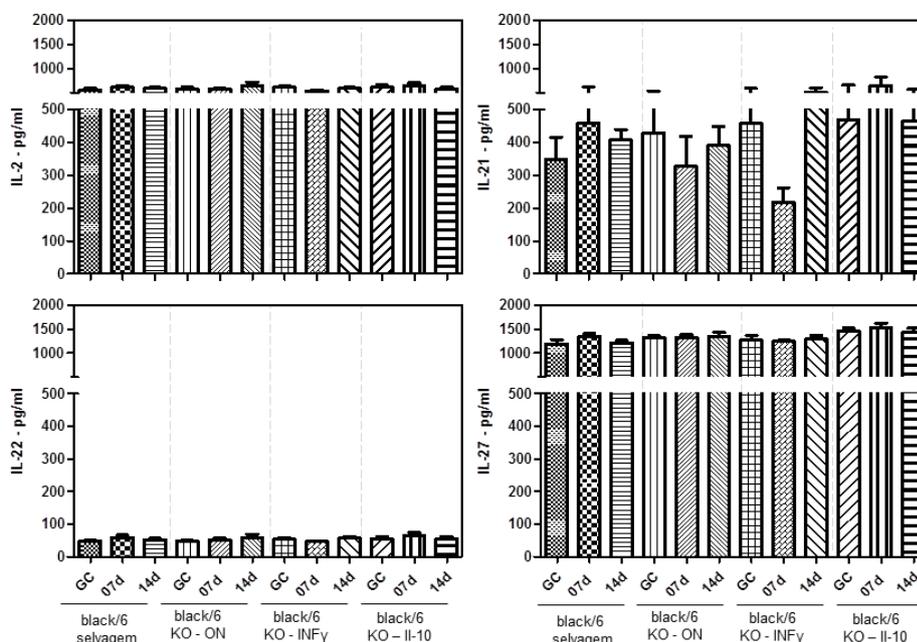


Figura 17 – Determinação da produção das citocinas IL-02, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6e Swiss*. Os animais, de cada linhagem estudada, foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^2$ /ml da estirpe C57 de *C. pseudotuberculosis*, por via peritoneal. Estes animais foram avaliados após 07, 30, 60 e 120 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde não foi possível identificar uma diferença estatística significativa em nenhuma citocina avaliada em nenhum grupo estudado.

**Caracterização da Resposta Imune Após Infecção com Duas Diferentes Linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em Camundongos *Balb/c***

Ricardo Evangelista Fraga<sup>a,b</sup>; Heidiane Alves<sup>a</sup>; Milton Galdino Oliveira Neto<sup>a</sup>; Marcos da Costa Silva<sup>a</sup>; Andréia Pacheco<sup>a</sup>; Geraldo Pedral Sampaio<sup>a</sup>; Vera Vale<sup>a</sup>; Roberto Meyer<sup>a,c</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil. <sup>b</sup> Núcleo de Tecnologia em Saúde, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil. <sup>c</sup> Membros do INCT-DT/MCT/CNPq.

**\*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- 9966-9056

Fax: 55-71-3235-9682

Endereços de e-mail: ricardo.fraga@ufba.br (R. Fraga)

rmeyer@ufba.br (R. Meyer)

## Resumo

Este estudo trata sobre a Linfadenite Caseosa, doença crônica ocasionada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*C.p.*), microrganismo intracelular facultativo. Visa distinguir o perfil da resposta imune estabelecida durante a infecção com duas diferentes linhagens de *C.p.* em camundongos *Balb/c*, e desta forma estabelecer as peculiaridades da resposta imune desencadeada por cada linhagem. Para tanto, 15 camundongos *Balb/c*, divididos em três grupos foram infectados com  $10^4$ /ml de uma estirpe denominada T1 ou da estirpe C57 de *C.p.* e avaliados após 70 dias de infecção. Realizou-se a avaliação morfológica (presença de granuloma e peso do baço); avaliação do direcionamento celular para o local da infecção (quantidade total e diferencial de células peritoneais); imunofenotipagem (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>); bem como a mensuração das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no homogenato do baço. Os resultados encontrados contribuem para uma melhor compreensão do tipo de resposta, e dos mecanismos imunológicos envolvidos durante infecção com diferentes linhagens de *C.p.*, onde a estirpe C57 apresentou alterações morfológicas (presença de granulomas e peso de baço) mais acentuadas, assim como um maior direcionamento de células para o local da infecção e uma tendência para o aumento de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do que a estirpe T1. Desta forma, é possível identificar que o mesmo microrganismo pode apresentar mecanismos de virulência distintos, que podem por sua vez, interferir no processo de estabelecimento da doença. Ademais foi possível confirmar a atenuação observada na linhagem T1, bem como o caráter virulento da linhagem C57.

**Palavras-chaves:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Camundongos *Balb/c*. Resposta Imune.

## 1. Introdução

No Brasil, a caprino e ovinocultura está em franca expansão, principalmente na região Nordeste, que tem na Bahia o estado com o maior rebanho de caprinos do País (BRASIL, 2010), constituindo as principais fontes econômicas e nutricionais de muitas famílias (RIBEIRO et al., 1988; MOURA-COSTA, 2002; MEYER, 2004; DORELLA et al, 2006a). Entre os principais agravos encontrados nestas culturas está a Linfadenite caseosa, doravante (LC), doença responsável por grandes perdas econômicas, uma vez que esta patologia é a responsável por comprometimento do couro, além de ocasionar perda de peso, desordens reprodutivas (como abortos e mortalidade neonatal), diminuição da produção de carne e lã, condenação da carne e diminuição da produção de leite, nos animais (NAIRN & ROBERTSON, 1974; AYERS, 1977; ASHFAQ & CAMPBELL, 1979; BURREL, 1981; EGGLETON et al., 1991; ALONSO et al. 1992), apresentando alta prevalência na Bahia (MEYER, 2004; SEYFFERT et al, 2009).

Este agravo, também conhecido como mal do caroço ou falsa tuberculose, é uma doença infectocontagiosa crônica, cujo agente etiológico é *Corynebacterium pseudotuberculosis*, microrganismo gram positivo, pleiomórfico, patógeno intracelular facultativo de fagócitos, relacionado filogeneticamente com *Mycobacterium tuberculosis* (PASCUAL et al., 1995; MEYER et al., 2002; DORELLA, 2006a). Biberstein e seus colaboradores (1971) propuseram a existência de dois biótipos de *C. pseudotuberculosis* respaldados na capacidade identificada nestas bactérias em reduzir ou não nitrato em nitrito. A partir destas observações foram propostos que as bactérias nitrato redutase positivo seriam nomeados de biótipo *equi*, por terem sido isolados de cavalos e bovinos; e os microrganismos nitrato redutase negativo seriam o biótipo *ovis*, neste caso, isolados de pequenos ruminantes e bovinos (SONGER et al.,1988). Entretanto, é possível identificar uma maior variedade de linhagens de *C. pseudotuberculosis*, ao avaliar as diferenças relacionadas ao tipo de resposta imune montada no hospedeiro, apresentando diferentes graus de virulência (NIETO et. al., 2009; SOUZA, 2009; SILVA, 2010).

Esta doença é caracterizada pela formação de lesões granulomatosas, que podem acometer tanto regiões superficiais dos animais, principalmente nos gânglios linfáticos superficiais, como também órgãos internos como pulmões, baço, rins e fígado (KIMBERLING, 1988; BERNABÉ et al., 1991; SMITH e SHERMAN, 1994; PEKELDER,2000; SOBRINHO, 2001;

DORELLA et al., 2006c; CRAWSHAW et al., 2008). A imunidade a *C. pseudotuberculosis*, como em outros patógenos intracelulares, tem sido atribuída a mecanismos básicos tanto da resposta inata, através da ação da fagocitose, como da adaptativa, principalmente envolvendo a subpopulação Th1, que atua principalmente na produção de INF-gama que age sobre as células fagocíticas aumentando o seu poder de eliminação dos microrganismos (LAN et al., 1998; VALE, 2000; BURMESTER e PEZZUTO, 2003).

A infecção experimental de camundongos com *C. pseudotuberculosis* resulta em sinais clínicos, perfil de hemograma e bioquímica sérica, bem como as alterações histopatológicas em órgãos viscerais similares aos observados em pequenos ruminantes infectados pela mesma bactéria (VALE, 2005; SOUZA, 2009; SILVA, 2010; JESSE, et al., 2011). Desta forma, esta espécie vem sendo utilizada como modelo para este agravo. Além disso, a possibilidade de realizar a remoção de um gene de interesse nesta espécie, produzindo animais *knockout*, cada vez mais vem sendo aplicada com a finalidade de implementar a compreensão a respeito do envolvimento de determinados elementos da resposta imune frente a diversas infecções, como as envolvidas na infecção por esta bactéria (SIMMONS et al., 1997; PACHECO et al., 2012).

Desta forma, o presente estudo visa distinguir o perfil da resposta imune estabelecida durante a infecção com duas diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* em camundongos *Balb/c*, e desta forma estabelecer as peculiaridades da resposta imune desencadeada por cada linhagem. Estas avaliações são importantes para auxiliar nos estudos para o estabelecimento de linhagens atenuadas/virulentas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de vacinas, imunoterapia e kits diagnósticos.

## 2. Materiais e Métodos

### 4.2 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Para a realização da infecção dos animais foram empregadas, tanto a estirpe denominada C57 quanto a T1, pertencentes à biblioteca do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA). A linhagem C57 foi isolada de um caprino naturalmente infectado e identificada através da cultura de *Corynebacterium* spp., sorologia para Linfadenite Caseosa e PCR multiplex direto dos materiais dos granulomas para identificação de *C. pseudotuberculosis* caracterizada por PCR multiplex. Esta bactéria foi obtida em coleta realizada em 2010 (FEHLBERGA, 2011 - artigo submetido à publicação - em anexo 01).

A linhagem T1, por sua vez, foi isolada de um caprino naturalmente infectado da região de Santa Luz-BA e doado pelo Dr. Artur Hage, pesquisador da EBDA, para o Laboratório de Microbiologia do ICS-UFBA, no ano 2000, onde foi realizada a identificação pelo teste “API coryne” (BioMérieux AS, Marcy-l’Etoile, França), e após sucessivas culturas em meio específico foi considerada atenuada por apresentar hemólise sinérgica com *Rhodococcus equi* menos intensa que estirpes recentemente coletadas de caprinos naturalmente infectados.

Com a finalidade de promover a infecção estas linhagens foram quantificadas seguindo-se o protocolo estabelecido por Pedral (2012). Resumidamente, 05 mL, de uma cultura mantida durante 48h a 37°C de 250 ml, foram retirados. Este material foi lavado duas vezes, em solução salina, através de centrifugações de 04 min. a 8.000xg. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescido o SYBR Safe™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e incubou-se por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Nova lavagem foi realizada para a remoção dos reagentes e o sedimento bacteriano foi ressuspenso e mensurado no citômetro de fluxo. Para isso, foram utilizados tubos TruCount (Becton Dickson, EUA), contendo sedimento de microesferas fluorescentes, com a quantidade de *beads* constantes em cada lote. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo: Bactérias totais =  $(N^0 \text{ beads eventos bactérias} / N^0 \text{ de beads A+B}) \times N^0 \text{ de Beads por } \mu\text{l}$ .

### 4.3 Animais

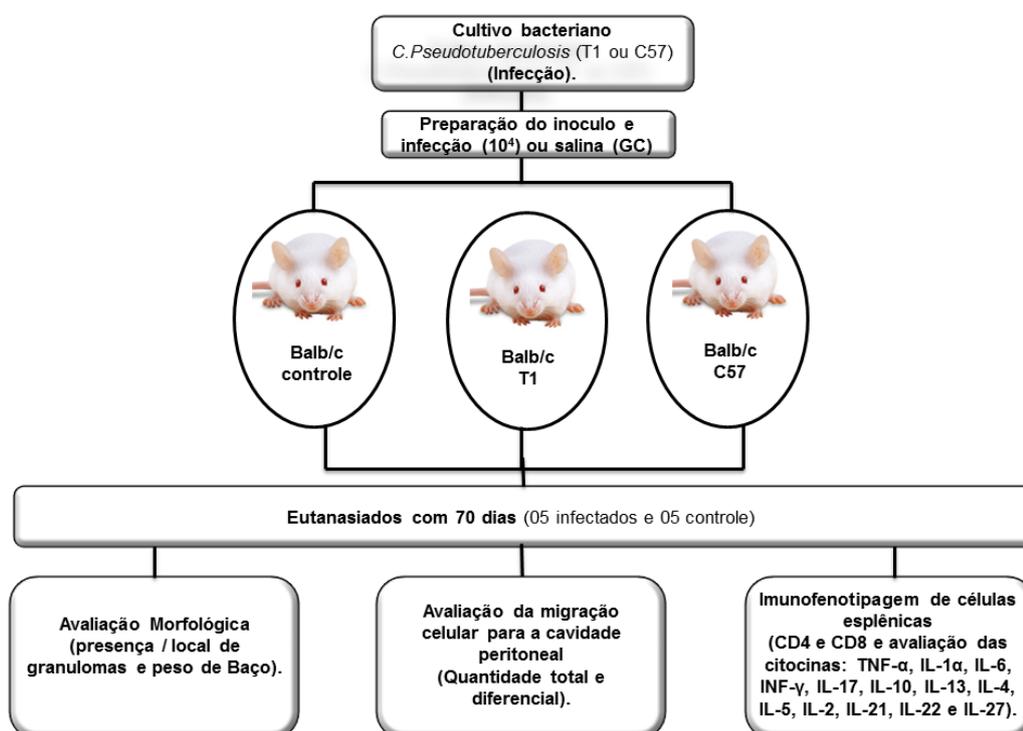
Para a realização deste experimento foram utilizados 15 camundongos *Balb/c*, com idade entre 06 - 08 semanas, de ambos os sexos, adquiridos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ-Salvador-BA).

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

Este estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, sob protocolo nº 006/2010.

### 2.3 Infecção

Os animais foram divididos em três grupos de cinco camundongos cada, o primeiro grupo (grupo controle) recebeu apenas um (01) ml de salina (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ), enquanto que o segundo e terceiro grupos foram infectados com  $10^4$ /ml da bactéria, diluídos em um (01) ml de salina (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ), da linhagem T1 e C57 respectivamente. Após a infecção os animais foram avaliados depois de 70 dias de infecção, (desenho experimental 03).



#### 4.4 Avaliação Morfológica

##### 4.4.1 Presença e Localização de Granuloma

Em seguida à eutanásia os camundongos foram vistoriados, tanto externamente quanto na abertura das cavidades peritoneal e torácica, para a observação da existência de granulomas, bem como, do local de sua ocorrência.

##### 4.4.2 Determinação do peso do baço

Após a eutanásia dos animais, o peso corporal, seguido pelo do baço, foram obtidos utilizando Balança de precisão (Marte Balança e Aparelhos de Precisão LTDA, São Paulo-SP). A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%.

#### 4.5 Avaliação da Resposta Imune

A avaliação da resposta imune dos camundongos infectados com estas duas linhagens de *C. pseudotuberculosis* foi estimada tanto em relação à resposta imune inata, quanto em relação à resposta imune adaptativa, na sua vertente celular.

#### 4.5.1 Resposta Imune Inata

##### 4.5.1.1 Avaliação da migração celular para a cavidade peritoneal

A avaliação da migração celular para a cavidade peritoneal (local da realização da injeção) foi realizada através da quantificação total de células e do diferencial destas. Com este intuito, após a eutanásia, procedeu-se a assepsia do abdômen e exposição do peritônio, seguidamente, foi injetado, em condições assépticas, 1,5mL de salina estéril (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ). Em seguimento, foi realizada uma massagem, por em média 30 segundos, e este material foi recuperado. Após definição do volume readquirido, este foi acondicionado em microtubos eppendorf, dos quais 40µl foram utilizados para contagem de células totais através de um contador automático de células (Hemocytometer CELM cc-530, CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri-SP), 60µl foram utilizados na preparação de citoesfregaço, em duplicata, através de centrifugações de 16 minutos a 500xg em temperatura ambiente, utilizando uma citocentrífuga de bancada Presvac CT12 (Prevac, Balneario Camboriu - Santa Catarina fabricante).

As lâminas do citoesfregaço foram coradas utilizando-se para isso uma mistura dos corantes hematológicas *Wright* e *Giemsa* (Sigma Chemical Co., EUA). Resumidamente, as lâminas foram cobertas com 15 a 20 gotas do corante, deixando-o agir por três (03) minutos, seguidamente foi acrescido 20 gotas de água destilada por 12min., finalizando com uma lavagem em água corrente. O perfil das células da cavidade foi determinado através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal, utilizando-se para isso um microscópio Biológico binocular modelo L-1000 bac (Bioval, Bauru-SP) em objetiva de imersão (aumento de 1000X).

#### 4.5.2 Resposta Imune Adaptativa

A avaliação da resposta imune adaptativa, na sua vertente celular, foi realizada através da mensuração da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> presentes no baço no momento da eutanásia de cada animal, através da imunofenotipagem realizada pela citometria de fluxo, além da quantificação de citocinas presentes neste órgão.

O baço de cada animal foi removido e transferido para uma placa de petri de 40x12mm, e após a sua pesagem, foi removido um fragmento de 50mg que foi macerado em 500 µL de solução inibidora de proteases (Sigma Aldrich Brasil Ltda.) gerando uma suspensão celular. Cada suspensão foi submetida à centrifugação a 450xg por 10 minutos a 4°C. A partir de então, o sobrenadante das amostras foi adequadamente armazenado à - 20°C para serem utilizados na quantificação de citocinas. Enquanto que, o sedimento celular foi ressuspenso em três ml de salina, 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.

A imunofenotipagem foi realizada pela avaliação da expressão das proteínas CD3, CD4 e CD8 na superfície celular. Para tanto, foram utilizados anti-CD3 conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-CD8a conjugado com PE-Cy®5.5 e anti-CD4 conjugado com R-PE (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Todos os anticorpos monoclonais (AcMO) foram previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso. As células esplênicas foram ajustadas em 500.000 células (eventos) diluídas em 500 µL do tampão de ensaio, em seguida os anticorpos monoclonais foram acrescentados e esta mistura foi incubada, em câmara escura, durante 15 minutos. Findado o período de incubação, foi adicionado um ml do tampão de ensaio em cada tubo, e em seguida foi realizada uma centrifugação a 7500xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e acrescentado 500µL de tampão de ensaio. 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).

A dosagem das citocinas presentes no homogenato do baço foi realizada por meio de ensaio para detecção por Citometria de Fluxo, utilizando-se para isso, *Kit* comercial 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, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Resumidamente, os padrões das citocinas avaliadas foram reconstituídos em água destilada estéril de acordo com a concentração previamente recomendada no *Kit*, para serem

utilizadas na elaboração de um *mix* de citocinas, que por sua vez, foi empregado na elaboração de uma diluição seriada, utilizada como a curva padrão do ensaio. Posteriormente, foi elaborado o *mix* das *beads* de captura, onde as *beads* referentes a cada citocina analisada foram agrupadas em um tubo Falcon de 15ml e centrifugadas a 7500xg por 05 minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente desprezado e o sedimento resuspenso com o mesmo volume de tampão de ensaio. Seguidamente, o *mix* do conjugado biotilado foi preparado também diluído em tampão de ensaio. Desta forma, o experimento foi realizado, adicionando em tubos previamente identificados a seguinte ordem: padrões das citocinas ou as amostras, em seguida o *mix* de *beads* e por ultimo o *mix* de conjugados biotilados. Estes foram incubados ao abrigo de luz e a 4°C por duas horas. Findado o período de incubação, foi adicionado um (01)ml do tampão de ensaio em cada tubo que foi seguido por uma centrifugação a 7500xg durante 05 minutos. Seguidamente, foi removido 700 µL do sobrenadante e novamente lavado com o mesmo volume de tampão, que foi seguido da remoção do sobrenadante e posterior adição de 20 µL de streptoavidina-PE. Os tubos foram então homogeneizados e incubados no escuro por uma (01) hora, ao passo que, findado este período, as amostras foram novamente lavadas duas vezes e por fim resuspenso em 500µL de tampão de ensaio e acondicionadas isentas da luz a 4°C *overnight*, para posterior leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o FlowCytomix Pro Software, conforme orientações do fabricante.

### 2.1.3 Análise Estatística

Com o objetivo de avaliar aspectos da relação *parasito-hospedeiro* durante a infecção com as diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis* em camundongos *Balb/c*, considerando a avaliação morfológica, a avaliação da migração para a cavidade peritoneal, a imunofenotipagem de esplenócitos e a dosagem de citocinas, 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 (BIOSTAT, 2007; FISHER, 1993) e as tendências centrais dos grupos independentes, dois a dois, foram comparadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney (CALLEGARI-JACQUES, 2003). O valor fixado para significância estatística foi de  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

Buscando caracterizar a resposta imune de camundongos *Balb/c* infectados com a bactéria T1 (considerada atenuada) ou com a bactéria C57 (considerada selvagem) de *C. pseudotuberculosis* após 70 dias do desafio, foi realizada uma avaliação morfológica, bem como, uma caracterização da resposta imune, tanto na sua vertente da resposta imune inata, quanto adaptativa. Todas as médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ), de cada experimento realizado, encontram-se no Apêndice C.

#### 3.1 Avaliação Morfológica

A apreciação morfológica foi contabilizada em relação ao surgimento de granulomas, descrevendo os locais onde sucederam a sua ocorrência. Como também, através da avaliação referente ao peso do baço.

A presença/formação de granulomas no grupo de animais infectados com a estirpe T1 foi observada apenas em um animal de cinco avaliados. Estes granulomas foram identificados em duas localizações diferentes, um no linfonodo e o outro no rim. No entanto, para o grupo dos animais infectados com a bactéria C57, todos os cinco animais apresentaram granulomas, sendo estes ocorridos em: nove linfonodos, um no fígado e dois em testículos. (tabela 01 e 02).

Os valores encontrados referentes à relação entre o peso corporal e o peso do baço dos animais, estão apresentados na figura 01; a comparação entre os grupos infectados e o grupo controle (animais que receberam apenas salina), realizada por Kruskal-Wallis, revelou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0031$ ), tendo, a comparação das médias entre os grupos, por Mann Whitney, a seguinte relação: grupo dos animais infectados com C57 (GC57) > grupo dos animais infectados com T1 (GT1) > Grupo Controle (GC).

#### 3.2 Avaliação da Resposta Imune

Para a caracterização da resposta imune dos animais *Balb/c* infectados com a T1 ou com a C57, foi avaliada a resposta imune inata, pela determinação da quantidade total, bem como o

diferencial, de células da cavidade peritoneal. Para a avaliação da vertente celular da resposta imune adaptativa, procedeu-se a imunofenotipagem para  $CD4^+$  e  $CD8^+$  e a avaliação da produção de citocinas no macerado do baço.

### 3.2.1 Avaliação da Resposta Imune Inata

A avaliação da resposta imune inata foi caracterizada pela quantificação total e diferencial de células recuperadas da cavidade peritoneal após a eutanásia dos animais. A figura 02 representa os valores encontrados para quantificação total de células, na qual é possível notar a diferença estatística significativa ( $p = 0,0077$ ) com a seguinte relação:  $GC57 > GT1 > GC$ .

Os valores relacionados à avaliação do diferencial celular presente na cavidade peritoneal dos grupos examinados estão apresentados na figura 03. Macrófagos, linfócitos e neutrófilos foram encontrados em números superiores quando os grupos testes foram comparados ao grupo controle injetado apenas com salina ( $p = 0,0075$ ;  $p = 0,0344$ ;  $p = 0,0068$ , respectivamente). No entanto, os grupos injetados com T1 ou C57 não diferem entre si para qualquer das células analisadas. A relação entre todos os grupos está apresentada: macrófagos –  $GC57 = GT1 > GC$ ; Linfócitos –  $GC57 = GT1 > GC$  e Neutrófilos –  $GC57 = GT1 > GC$ .

### 3.2.2 Avaliação da Resposta Imune Adaptativa

As médias de intensidade de fluorescência (MIF) estão apresentadas na figura 04. Tanto a avaliação para  $CD4^+$ , quanto para  $CD8^+$ , não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Para a análise da produção das citocinas, elas foram agrupadas em citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17), citocinas do perfil Th3 e Th2 (IL-10, IL-13, IL-4 e IL-5), e citocinas relacionadas ao direcionamento do perfil Th1 ou Th2 dos linfócitos T (IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27). É possível observar um aumento apenas na produção de IL-6 ( $p = 0,0221$ ) com a seguinte relação entre os grupos:  $GT1 > GC = GC57$  (Figura 05). Na figura 06 estão demonstrados os resultados das citocinas relacionadas com o perfil Th3 e Th2, onde é possível identificar uma diferença estatística significativa para a citocina IL-13, com  $p = 0,0344$ , e apresentando a seguinte relação:  $GT1 > GC$ . Na figura 07 estão

demonstrados os resultados das citocinas relacionadas com o direcionamento para um perfil Th1 ou Th2, respectivamente, nestes dados não foram identificadas diferenças estatísticas significativas.

#### 4 Discussão

Objetivando comparar a resposta imune estabelecida pela infecção por duas diferentes linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma considerada atenuada (T1) e outra selvagem (C57), camundongos *Balb/c* foram infectados com  $10^4$  destes microrganismo e avaliados após 70 dias.

A estirpe selvagem (C57) foi isolada de um caprino naturalmente infectado e identificada através da cultura, biologia molecular e capacidade de estimular a produção de anticorpos específicos em caprinos (FEHLBERGA, 2011 – artigo submetido à publicação – resumo no anexo 01). Esta linhagem foi escolhida por apresentar uma alta capacidade proliferativa, *in vitro*, em comparação com outras linhagens presentes no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde, ICS-UFBA, e por ter sido recentemente obtida. Alguns estudos correlacionam a virulência do patógeno com o potencial proliferativo, onde uma maior taxa de crescimento do microrganismo está relacionada com o surgimento das patologias (DUNN & NORTH, 1995; WEST & BUCKLING, 2002; KANA et al., 2007). Somando-se a isso, a escolha por utilizar uma linhagem recentemente isolada justifica-se pela observação que em microrganismos que são mantidos durante muito tempo em meios de cultura podem ser identificadas alterações em seus mecanismos de virulência, geralmente promovendo uma atenuação (BICE & ZELEDON, 1970; BARTLEY et al., 2006). Por sua vez, a linhagem atenuada (T1), que também foi isolada de um caprino naturalmente infectado em 2000, apresenta uma infecção mais branda, tanto em camundongos (SOUZA, 2009; SILVA, 2010) quanto em caprinos (MOURA-COSTA et al., 2007; LIMA, 2009) e vem sendo mantida em cultura no laboratório de microbiologia do ICS-UFBA.

Um dos parâmetros utilizados para a comparação entre estas duas estirpes foi a caracterização morfológica em animais infectados, que orçava a capacidade em ocasionar granulomas, além de aspectos envolvidos no comprometimento do baço pela avaliação do peso deste órgão. Está bem descrito na literatura que estirpes diferentes, de *C. pseudotuberculosis* (NIETO et al., 2009; SOUZA, 2009) ou de *Corynebacterium ulcerans*

(DIAS et al., 2011) ou de *Mycobacterium avium* (AMARAL et al., 2011) apresentam um tropismo para os diferentes órgãos de forma bem distinta entre cada linhagem. Esta característica também é demonstrada pelo uso de T1 e da estirpe selvagem C57 em camundongos *Blab/c*. A estirpe C57 promove o surgimento de granulomas em uma frequência maior (05/05) que a estirpe T1 (01/05), e embora tenha sido observada a formação de granulomas em órgãos como testículos, fígado e rins, claramente observam-se os linfonodos como os mais acometidos. Este dado está de acordo com a literatura, uma vez que, estes granulomas são observados principalmente nos linfonodos próximos da região de entrada do patógeno (WILLIAMSON, 2001; MEYER et al., 2005; FONTAINE, et al. 2006), além disso, este cocobacilo utiliza a via linfática ou a via sanguínea para se distribuir pelo organismo atingindo principalmente os linfonodos e baço (PERRY et al., 1997; SIMMONS et al., 1997; WANG, et al., 1999; BEAN, et al., 1999; ALLIE et al., 2010; AMARAL et al., 2011; PACHECO, et al., 2012).

O comprometimento do baço está correlacionado diretamente com a utilização da via sanguínea por diversos microrganismos para promover a disseminação gerando esplenomegalia (DUTTA et al., 2009; MATHURIN et al., 2009; DIAS et al., 2011; RODRIGUES-JUNIOR et al., 2012). Neste trabalho, foi possível notar que a linhagem C57 apresentou os maiores valores, entretanto os animais infectados com a linhagem T1 também apresentaram aumento quando comparados com o grupo controle. Desta forma, foi possível visualizar que a linhagem C57 conseguiu se distribuir de forma mais eficiente pelo organismo do animal, comprometendo diversos tecidos e intensificando a intensidade deste agravo. Contudo, a linhagem T1 estabeleceu uma infecção de forma mais branda, mas cujos sinais são detectáveis após 70 dias da infecção, fato este que pode fortalecer os estudos que se propõem em utilizar esta linhagem como uma vacina viva, já que estirpes muito atenuadas, que são rapidamente eliminadas pelo organismo do hospedeiro, não são eficientes em montar uma resposta protetora frente a este microrganismo (SIMMONS et al., 1997; SIMMONS et al., 1998).

A avaliação das células presentes no local da infecção contribui para a compreensão dos mecanismos utilizados pelo hospedeiro para tentar eliminar/conter esta bactéria, sendo assim, neste estudo foi realizada a avaliação do direcionamento celular para a cavidade peritoneal, local da realização das injeções, seguido da avaliação do diferencial celular. Foi possível identificar uma quantidade geral de células maior nos animais infectados com a C57, todavia, é notado um direcionamento maior que o grupo controle nos animais infectados com

a T1. Entretanto, a presença destas células pode contribuir para a disseminação deste microrganismo, uma vez que estes cocobacilos, por se tratar de bactérias intracelulares facultativas, podem sobreviver dentro dos fagócitos e utilizá-los para a disseminação no organismo do hospedeiro (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983). Este fato fortalece a associação entre a relação de maior quantidade de células direcionadas e maior surgimento de granulomas encontrados nos animais infectados com a linhagem C57. No diferencial foi identificada uma elevação do número de macrófagos, linfócitos e de neutrófilos destes dois grupos quando comparado ao grupo controle, mas não apresentam diferenças estatísticas significativas entre eles. A permanência destes neutrófilos durante tanto tempo (70 dias) se destaca, uma vez que foi descrito na literatura que, em lesões causadas por *C. pseudotuberculosis* em pequenos ruminantes, este tipo celular atua nos primeiros dias de infecção e depois desaparecem (PEPIN et al., 1992; PEPIN et al., 1994a; PEPIN et al., 1994b). Os neutrófilos são células essenciais para a defesa contra a infecção primária, atuando para restringir o crescimento da bactéria ou agindo sobre as células infectadas de forma independente das atuações dos macrófagos e das células NK (CONLAN & NORTH, 1991; ROGERS & UNANUE, 1993; SJÖSTEDT et al., 1994). Por outro lado, microrganismos intracelulares podem apresentar efeito anti-apoptótico em neutrófilos objetivando utilizá-los como células hospedeiras facilitando principalmente o mecanismo de disseminação (YOSHIIIE et al., 2000; AGA et al., 2002). Desta forma, a permanência desta célula e dos mecanismos de interação entre os neutrófilos e *C. pseudotuberculosis* necessitam ser mais avaliados, uma vez que foi demonstrado neste trabalho que estas células permanecem por mais tempo no local da infecção.

A resposta imune contra patógenos intracelulares facultativos envolve células T CD4<sup>+</sup>, principalmente da subpopulação Th1, com produção de INF- $\gamma$  e ativação de células fagocíticas; enquanto que linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão envolvidos tanto na produção de mais INF- $\gamma$ , como também na identificação e eliminação de células infectadas (ZHAN & CHEERS, 1993; PÉPIN et al., 1997; LAN et al., 1998; MURPHY et al., 2001; MACHADO et al., 2004; MATHURIN et al., 2009; BRANDÃO et al., 2012). Neste sentido, a avaliação da proporção de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, por meio da imunofenotipagem, como também a definição do grupo de citocinas produzidas no momento da eutanásia, e assim definir a ou as subpopulações encontradas, torna-se um valioso instrumento. No entanto, na comparação entre os grupos para as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, não foi possível identificar diferença estatística significativa.

Para contribuir com a definição do perfil celular estabelecido durante a infecção de *C. pseudotuberculosis* por estas duas linhagens da bactéria foram quantificadas as citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-27, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas foram mensuradas no sobrenadante do homogenato do baço, com o intuito de identificar quais eram as citocinas produzidas localmente (baço) e/ou de forma sistêmica no momento da eutanásia dos animais durante o percurso da infecção. Este procedimento já foi descrito, demonstrando variações estatisticamente significativas, para a avaliação de citocinas do homogenato de baço (AUJLA et al., 2008; NEWSOM et al., 2011; GOEL & BHANAGAR, 2012; JIM et al., 2012; ZHU et al., 2012); cérebro (DATTA & OPP, 2008; TRIBOUILLARD-TANVIER et al., 2009; NEWSOM et al., 2011); linfonodo mesenquimal (NEWSOM et al., 2011) ou de pulmão (CAMPBELL et al., 2006).

As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 foram agrupadas como citocinas pró-inflamatórias, neste grupo foi observado uma produção significativa apenas nos animais infectados com a linhagem T1 para a citocina IL-6. Esta citocina é importante no processo inflamatório principalmente por estimular a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e estimular a produção de neutrófilos (APPELBERG et al. 1994; LEAL et al. 1999; DIAS et al., 2011). A mensuração das proteínas de fase aguda não foi realizada neste experimento, entretanto, ao ser avaliado o diferencial das células nos animais infectados com a T1 é possível identificar um aumento dos neutrófilos no local da infecção, fato este que pode se justificar pela presença desta citocina, no entanto, não é relatada uma diferença neutrofílica significativa entre as duas linhagens estudadas, mesmo não sendo detectada a produção da IL-6 nos animais infectados com C57, além disso, esta linhagem (C57) atrai uma quantidade de células totais maior que a estirpe T1. Como a citocina IL-6 não é o único fator que atua na produção e direcionamento de neutrófilos outros elementos estão envolvidos nesta atração que podem ser moléculas específicas do próprio patógeno (DENG et al., 2012), sendo assim, e principalmente por apresentarem diferenças nos mecanismos de atuação, a bactéria C57 pode possuir moléculas que contribuam para esta atração celular.

O segundo grupo de citocinas avaliadas foram enquadradas como pertencentes ao perfil Th3 (IL-10 e IL-13) e perfil Th2 (IL-4 e IL-5), neste grupo foi relatada uma diferença estatística significativa para a citocina IL-13, que apresentou, para a linhagem T1, uma produção maior que a do controle, mas similar a produção encontrada com a infecção da C57. Esta citocina está diretamente relacionada com a resposta da subpopulação Th2, principalmente envolvida com resposta para helmintos (WYNN, 2003; PRICE et al, 2010),

entretanto o perfil Th2 pode contribuir para a formação/maturação de granulomas, que são importantes no controle de microrganismos intracelulares, através do estímulo para a produção de fibrinogênio e fatores de crescimento de tecido conectivo (MURRAY et al., 2006; REIMAN et al., 2006; McFARLANE, et al., 2011; LIU et al., 2012). Estudos recentes vêm demonstrando uma relação entre esta citocina e o estabelecimento de granulomas, além de contribuir para a eliminação de microrganismos intracelulares como a *Leishmania donovani* (MURRAY et al., 2006; McFARLANE et al., 2011). O recrutamento mais acentuado desta citocina pode ter contribuído no estabelecimento de uma infecção mais branda quando os animais foram infectados com a bactéria T1, já que estes animais apresentaram poucos granulomas, um direcionamento celular e aumento do peso do baço menor do que os animais infectados com a linhagem C57.

No entanto, muitas citocinas aqui analisadas apresentaram valores muito baixos, não sendo possível caracteriza-las de forma mais efetiva durante a infecção com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis*. Na verdade, a avaliação utilizando outro protocolo, como por exemplo, a mensuração em sobrenadante de cultura, deve ser apreciado para melhor compreender/relacionar a atuação destas citocinas na infecção, uma vez que já foi relatado diferenças na produção das citocinas IL-4, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  após estímulo em cultura de animais infecção com *C. pseudotuberculosis* (SOUZA, 2009; SILVA, 2010).

Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão do tipo de resposta, e dos mecanismos imunológicos envolvidos durante infecção com diferentes linhagens de *C. pseudotuberculosis*, onde a estirpe C57 apresentou alterações morfológicas (presença de granulomas e peso de baço) mais acentuadas, assim como um maior direcionamento de células para o local da infecção do que a estirpe T1. Desta forma, é possível identificar que o mesmo microrganismo pode apresentar mecanismos de virulência distintos, que podem por sua vez, interferir no processo de estabelecimento da doença. Ademais, foi possível confirmar a atenuação observada na linhagem T1, bem como o caráter virulento da linhagem C57. Estudos focalizando quais seriam as possíveis diferenças entre estas linhagens podem auxiliar no estabelecimento/identificação de linhagens atenuadas, como também de moléculas candidatas ao desenvolvimento de vacinas e kits diagnósticos. Ademais, estes resultados fortalecem a compreensão dos mecanismos imunológicos desenvolvidos pela bactéria T1, considerada atenuada, frente à infecção em camundongos *Balb/c*. Esta linhagem (T1) vem sendo avaliada para o desenvolvimento de uma vacina viva frente a este microrganismo, desta forma, estes dados podem direcionar as avaliações de protocolos de imunização/desafio.

## **Agradecimentos**

Este estudo teve apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), da Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAPEX) e do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Tabela 01. Quantidade (positivo/avaliado) de animais com presença de granulomas por grupo analisado.

Tempo	GC	GT1	GC57
70 dias	00/05	01/05	05/05
Total	00/05	01/05	05/05

Tabela 02. Principais regiões anatômicas acometidas com granulomas.

Região Anatômica	GC	GT1	GC57
Linfonodo	00	01	09
Fígado	00	00	01
Rim	00	01	00
Testículo	00	00	02
Total	00	02	12

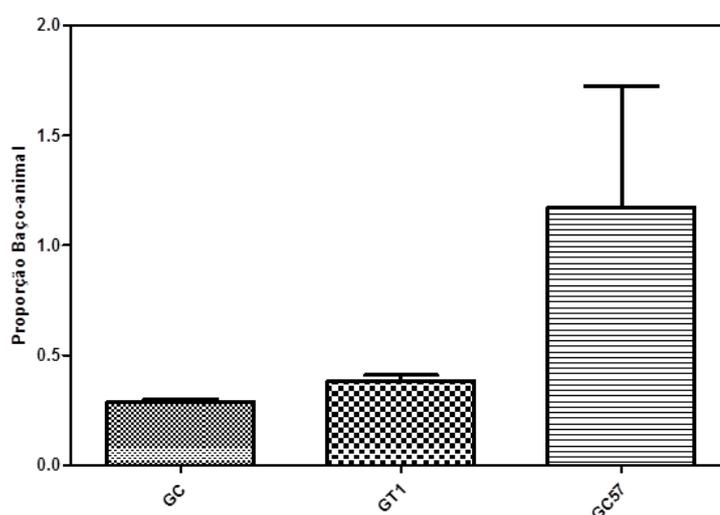


Figura 01 – Determinação do peso do Baço de camundongos *Balb/c*. Os animais foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^4$ /ml da estirpe T1 (GT1) ou  $10^4$ /ml da estirpe C57 (GC57) de *C. pseudotuberculosis* e avaliados após 70 dias. O peso corporal, seguido pelo do baço, foram obtidos. A relação entre o peso corporal e o peso do órgão foi determinada pela porcentagem que o órgão representava em comparação ao peso do corpo, sendo este considerado 100%. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, ( $p = 0,0031$ ), tendo, a comparação das médias entre os grupos, por Mann Whitney, a seguinte relação: GC57 > GT1 > GC.

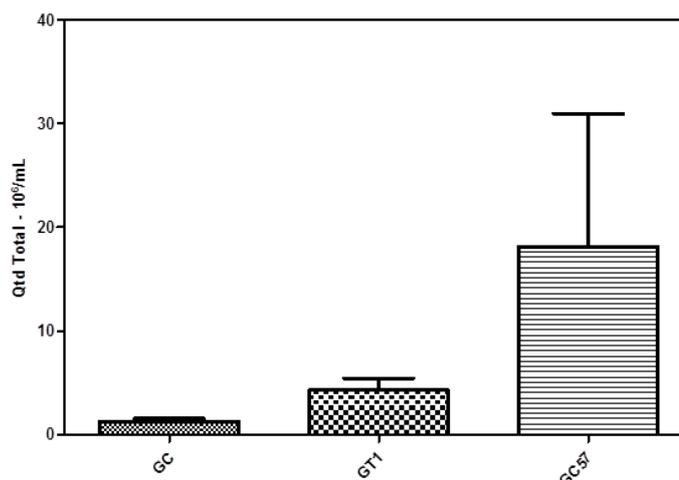


Figura 02 – Determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *Balb/c*. Os animais foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com 10<sup>4</sup>/ml da estirpe T1 (GT1) ou 10<sup>4</sup>/ml da estirpe C57 (GC57) de *C. pseudotuberculosis* e avaliados após 70 dias. Procedeu-se a quantificação total de células presentes na cavidade peritoneal através de um contador automático de células. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa ( $p = 0,0077$ ) e a seguinte relação pós-teste: GC57 > GT1 > GC.

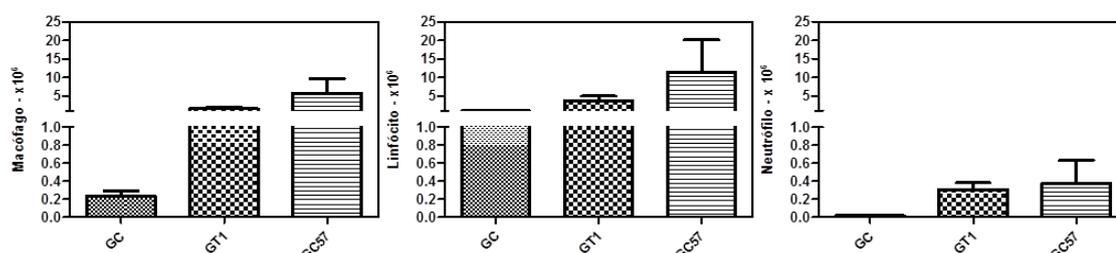


Figura 03 – Determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos *Balb/c*. Os animais foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com 10<sup>4</sup>/ml da estirpe T1 (GT1) ou 10<sup>4</sup>/ml da estirpe C57 (GC57) de *C. pseudotuberculosis* e avaliados após 70 dias. Foi realizada a avaliação através de características morfológicas de 200 leucócitos por animal. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, apresentando os seguintes valores: **Macrófagos** ( $p = 0,0075$ ), tendo como pós-teste a relação: GC57 = GT1 > GC; **Linfócitos** ( $p = 0,0344$ ), apresentando: GC57 = GT1 > GC e **Neutrófilos** ( $p = 0,0068$ ), com pós-teste: GC57 = GT1 > GC.

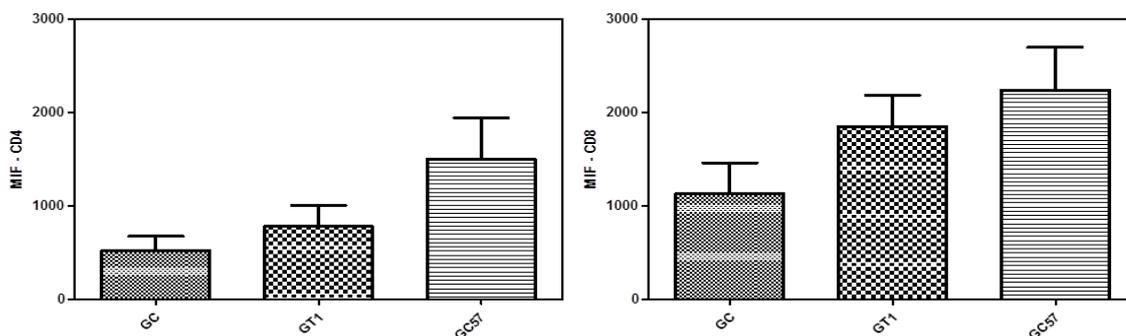


Figura 04 – Determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos camundongos *Balb/c*. Os animais foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou injetados com 10<sup>4</sup>/ml da estirpe T1 (GT1) ou 10<sup>4</sup>/ml da estirpe C57 (GC57) de *C. pseudotuberculosis* e avaliados após 70 dias, onde foi realizada a quantificação por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde não foi possível identificar diferença estatística significativa tanto para os valores do MIF de CD4<sup>+</sup>, quanto para os valores do MIF de CD8<sup>+</sup>.

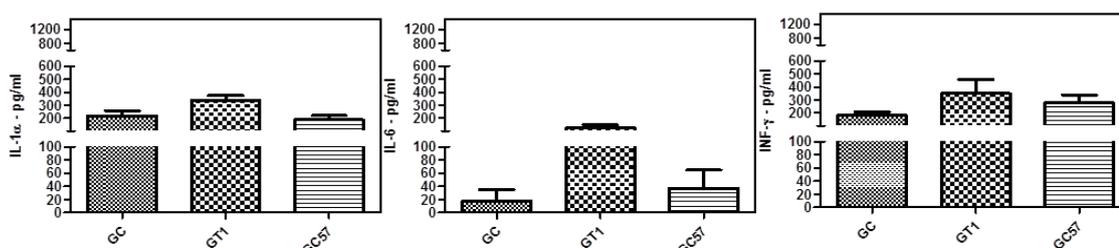


Figura 05 – Determinação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*. Os animais foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com 10<sup>4</sup>/ml da estirpe T1 (GT1) ou 10<sup>4</sup>/ml da estirpe C57 (GC57) de *C. pseudotuberculosis* e avaliados após 70 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que apresentou diferença estatística significativa para a citocina **IL-6** ( $p = 0,0221$ ), e demonstrando a seguinte relação: GT1 > GC = GC57. Não foi possível detectar diferenças estatísticas significativas para **IL-1 $\alpha$** , **INF- $\gamma$** . E não foram produzidos valores detectáveis das citocinas **TNF- $\alpha$**  e **IL-17**.

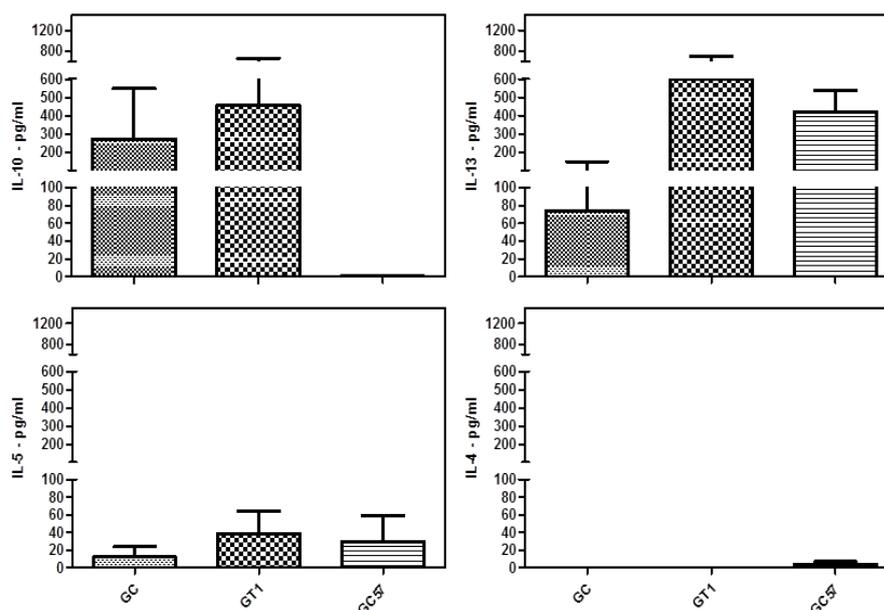


Figura 06 – Determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*. Os animais foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^4$ /ml da estirpe T1 (GT1) ou  $10^4$ /ml da estirpe C57 (GC57) de *C. pseudotuberculosis* e avaliados após 70 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, onde foi possível identificar uma diferença estatística significativa apenas para a citocina **IL-13** ( $p = 0,0344$ ), apresentando a seguinte relação:  $GT1 > GC$ . Não foi detectada diferença estatística significativa para as citocinas **IL-10**, **IL-5** e **IL-4**.

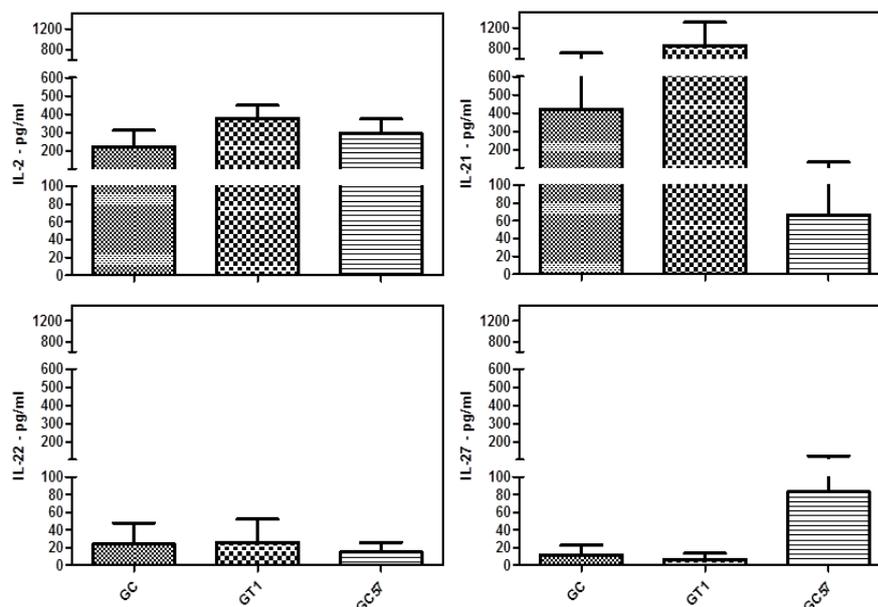


Figura 07 – Determinação da produção das citocinas IL-02, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*. Os animais foram injetados com salina (grupo controle - GC) ou infectados com  $10^4$ /ml da estirpe T1 (GT1) ou  $10^4$ /ml da estirpe C57 (GC57) de *C. pseudotuberculosis* e avaliados após 70 dias, onde a quantificação foi realizada por citometria de fluxo. A comparação entre os grupos foi realizada por Kruskal-Wallis, que não apresentou diferença estatística significativa.

## CONCLUSÃO

---

De acordo com os objetivos deste trabalho, pode-se concluir que:

- Os animais da linhagem *Balb/c* e *Swiss* foram mais sensíveis à infecção de *C. pseudotuberculosis* que os animais *C57Black/6* selvagem, uma vez que esta linhagem não apresentou óbitos em nenhum dos experimentos realizados e nem esplenomegalia;
- Óxido Nítrico (ON) é uma importante ferramenta, crucial para a sobrevivência dos camundongos frente à infecção com *C. pseudotuberculosis*, principalmente no início do processo infeccioso;
- A ausência da produção do ON ou de INF- $\gamma$  estão diretamente relacionados com o aumento no número de granulomas e do comprometimento do baço, quando infectados com  $10^7$  da estirpe atenuada;
- O aumento leucocitário observado nos animais da linhagem *Balb/c* e *Swiss* podem sugerir um maior comprometimento nestas linhagens;
- Ocorre uma produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células de camundongos da linhagem *C57Black/6*, fato este que pode contribuir com o caráter resistente destes animais a infecção por *C. pseudotuberculosis*;
- A bactéria viva pode promover a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, interferindo na ativação das células fagocíticas;
- É possível notar que nos camundongos da linhagem *Balb/c* ocorre uma diminuição de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, ao passo que, nos camundongos da linhagem *C57Black/6* não se alteram. Este fato pode corroborar com uma dificuldade em estabelecer uma resposta imune adaptativa satisfatória durante a infecção com *C. pseudotuberculosis*;

- O panorama da produção das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) sugere que os animais da linhagem *C57Black/6* tem um potencial maior em montar uma resposta imune protetora com recrutamento e ativação de células fagocíticas durante a infecção com *C. pseudotuberculosis*;
- Na linhagem *C57Black/6* ocorre a produção de citocinas voltadas para a um perfil Th1 (INF- $\gamma$ , IL-27), que favorece a eliminação de patógenos intracelulares;
- Os animais da linhagem *C57Black/6* demonstraram ser mais resistentes à infecção por *C. pseudotuberculosis* que os camundongos *Balb/c* e *Swiss*;
- A ausência da produção de ON e INF- $\gamma$  nos camundongos KO reforçam a importância destes elementos na defesa frente a *C. pseudotuberculosis*, uma vez que estes animais apresentaram uma infecção mais severa;
- A comparação entre as duas linhagens da bactéria aponta para uma maior virulência da estirpe selvagem (C57) e da confirmação da atenuação da bactéria T1 de *C. pseudotuberculosis*.

## REFERÊNCIAS

---

- ABATH, F. G., S. M. MONTENEGRO & GOMES, Y. M.. Vaccines against human parasitic diseases: an overview. **Acta Trop**, 71(3):237-54, 1998.
- ABBAS, A.K.; LINCHTMAN, A.H.; PROBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 6<sup>a</sup> ed. São Paulo: Elsevier, p. 251, 2008.
- ABREU S.R.O., MOTA, R.A., PINHEIRO JUNIOR J.W.P., ROSINHA G.M.S. & CASTRO R.S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 3, p. 502-509, 2008.
- AGA E, KATSCHINSKI DM, VAN ZANDBERGEN G, LAUFS H, HANSEN B, MÜLLER K, SOLBACH W, LASKAY T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J Immunol**. Jul 15;169(2):898-905, 2002.
- ALBAGHDADI H, ROBINSON N, FINLAY B, KRISHNAN L, SAD S. Selectively reduced intracellular proliferation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium within APCs limits antigen presentation and development of a rapid CD8 T cell response. **J Immunol**. Sep 15;183(6):3778-87, 2009.
- AL-GAABARY, H. M.; OSMAN, A. S.; OREIBY, F.A. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research** v. 87, p. 116–121, 2009.
- ALLIE, N., KEETON, R., COURT, N., ABEL, B., FICK, L., VASSEUR, V., VACHER, R., OLLEROS, M. L., DRUTSKAYA, M. S., GULER, R., NEDOSPASOV, S. A., GARCIA, I., RYFFEL, B., QUESNIAUX, V. F. J., JACOBS, M., Limited role for lymphotoxin  $\alpha$  in the host immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol**. 185, 4292-4301, 2010.
- 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. e PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas. **Sociedade Nacional de Agricultura**, ano 100, 1997.
- AMARAL, E. P., KIPNIS, T. L., CARVALHO, E. C. G., SILVA, W. D., LEÃO, S. C., LASUNSKAIA, E. B., Difference in virulence of *Mycobacterium avium* isolates sharing indistinguishable DNA fingerprint determined in murine model of lung infection. **PLoS ONE**. 6(6), 2011.
- 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.
- APPELBERG R., CASTRO A. G., PEDROSA J., MINOPRIO P. Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. **Immunology** 82:361–364, 1994.

ARAYA LN, ELZER PH, ROWE GE, ENRIGHT FM, WINTER AJ. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. **J Immunol.** Nov 15;143(10):3330-7, 1989.

ARSENAULT J, GIRARD C, DUBREUIL P, DAIGNAULT D, GALARNEAU JR, BOISCLAIR J, SIMARD C, BÉLANGER D. 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**, p. 1161-1165, Aug. 1979.

AUJLA, S. J., CHAN, Y. R., ZHENG, M., FEI, M., ASKEW, D. J., POCIASK, D. A., REINHART, T. A., MCALLISTER, F., EDEAL, J., GAUS, K., HUSAIN, S., KREINDLER, J. L., DUBIN, P. J., PILEWSKI, J. M., MYERBURG, M. M., MASON, C. A., IWAKURA, Y., KOLLS, J. K., IL-22 mediates mucosal host defense against gram-negative bacterial pneumonia. **Nature Medicine.** 14(3), 275-281, 2008.

AUTENRIETH, I. B., BEER, M., BOHN, E., KAUFMANN, S. H., HEESEMANN, J., Immune response to *Yersinia enterocolitica* in susceptible Balb/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. **Infect. Immun.** 62(6), 2590-2599, 1994.

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA**, n. 171, p. 1251-1254, 1977.

BAI, H., CHENG, J., GAO, X., JOYEE, A. G., FAN, Y., WANG, S., JIAO, L., YAO, Z., YANG, X. IL-17/Th17 promotes type 1 cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. **J. Immunol.** Nov 1;183(9):5886-95. 2009.

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

BARTLEY, P. M., SALES, S. W. J., BUSXTON, F. C., INNES, E. A., Long-term passage of tachysoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* *in vivo*. **Parasitology.** 133, 421-432, 2006.

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.

BATTEY, Y. M.; TONGE, J. I. Human infection with *Corynebacterium ovis*. **The Medical Journal of Australia**, n. 2, p. 540-543, 28 Sept. 1968.

BEAN, A. G. D., ROACH, D. R., BRISCOE, H., FRANCE, M. P., KORNER, H., SEDGWICK, J. D., BRITTON, W. J., Structural deficiencies in granuloma formation in TNF

gene-targeted mice underlie heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J. Immunol.** 162, 3504-3511, 1999.

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

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.

BERNABÉ, A., GÓMEZ, M. A., NAVARRO, J.A, GÓMEZ, S., SÁNCHEZ, J., SIDRACH, J., MENCHEN, V., VERA, A., SIERRA, M. A. Morphopathology of caprine tuberculosis. II. Generalization of tuberculosis. **An. Vet.** (Murcia). 6-7, 1991.

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

BICE DE, ZELEDON R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). **The Journal of Parasitology.** Aug; 56(4):63-7, 1970.

BILLINGTON SJ, ESMAY PA, SONGER JG, JOST BH. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letter.** v. 208, p. 41-45, 2002.

BOEHM U, KLAMP T, GROOT M, HOWARD JC. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.749, 1997.

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

BOUSSIOTIS VA, TSAI EY, YUNIS EJ, THIM S, DELGADO JC, DASCHER CC, BEREZOVSKAYA A, ROUSSET D, REYNES JM, GOLDFELD AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. **J Clin Invest.** May;105(9):1317-25, 2000.

BRAGA, W, SCHUL S, NU A, PEZO D, FRANCO E. A primary *Corynebacterium pseudotuberculosis* low dose infection in alpacas (*Lama pacos*) protects against a lethal challenge exposure. **Small Rumin Res** 72: 81-86, 2007.

BRAITHWAITE CE, SMITH EE, SONGER JG, REINE AH. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vet Microbiol.** Dec;38(1-2):59-70, 1993.

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

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

BROGDEN KA, CHEDID L, CUTLIP RC, LEHMKUHL HD, SACKS J. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. **Am J Vet Res** 51: 200-202, 1990.

BROGDEN KA, GLENN JS, EAST N, AUDIBERT FA. *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin with muramyl dipeptide induces antibody titers, increases the time of onset, and decreases naturally occurring external abscesses in sheep and goats. **Small Rumin Res** 19: 161-168, 1996.

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

BURRELL, D. H. Caseous lymphadenitis in goats. **Aust. Vet. J.**, n. 57, p. 105-110, 1981.

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

CABRERA PA, IRABEDRA P, ORLANDO D, RISTA L, HARÁN G, VIÑALS G, BLANCO MT, ALVAREZ M, ELOLA S, MOROSOLI D, MORAÑA A, BONDAD M, SAMBRÁN Y, HEINZEN T, CHANS L, PIÑEYRO L, PÉREZ D, PEREYRA I. 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.

CALLEGARI-JACQUES, SM. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CAMERON CM, MINNAAR JL, ENGELBRECHT MM, PURDOM MR. Immune response of merino sheep to inactivated *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccine. **Onderstepoort J Vet Res** 39:11-24, 1972.

CAMERON P. SIMMONS, ADRIAN L. M. HODGSON, RICHARD A. STRUGNELL. Attenuation and Vaccine Potential of *aroQ* Mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Infection And Immunity**, p. 3048–3056. Aug. 1997.

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

CAMPBELL, J. D., BUCKLAND, K. F., MCMILLAN, S. J., KEARLY, J., OLDFIELD, W. L. G., STERN, L. J., GRÖNLUND, H., VAN HAGE, M., REYNOLDS, C. J., BOYTON, R. J., COBBOLD, S. P., KAY, A. B., ALTMANN, D. M., LLOYD, C. M., LARCHÉ, M., Peptide immunotherapy in allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. **J. Exp. Med.** 206(7), 1535-1547, 2006.

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 de Mestrado em Imunologia**. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

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

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

CARTER NA, VASCONCELLOS R, ROSSER EC, TULONE C, MUÑOZ-SUANO A, KAMANAKA M, EHRENSTEIN MR, FLAVELL RA, MAURI C. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. **J Immunol**. May 15;186(10):5569-79, 2011.

COFFMAN, R. L. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. **Nat Immunol** 7(6): 539-41, 2006.

CHAPLIN PJ, DE ROSE R, BOYLE JS, MCWATERS P, KELLY J, TENNENT JM, LEW AM, SCHEERLINCK JP. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infect Immun** 67: 6434-6438, 1999.

CHEN CY, HUANG D, WANG RC, SHEN L, ZENG G, YAO S, SHEN Y, HALLIDAY L, FORTMAN J, MCALLISTER M, ESTEP J, HUNT R, VASCONCELOS D, DU G, PORCELLI SA, LARSEN MH, JACOBS WR JR, HAYNES BF, LETVIN NL, CHEN ZW. A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. **PLoS Pathog**. Apr;5(4):e1000392, 2009.

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

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

CONLAN JW, NORTH RJ. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. **J Exp Med**. Sep 1;174(3):741-4, 1991.

COTTREZ, F.; HURST, S. D.; COFFMAN, R. L.; GROUX, H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. **J. Immunol**. 165: 4848-4853, 2000.

CRAWSHAW, T. DANIEL, R., CLIFTON-HADLEY, R., CLARK, J., EVANS, H., ROLFE, S., RUA-DOMENECH, R. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. **Vet Rec**. 163 (4), 127, 2008.

DATTA, S. C., OPP, M. R., Lipopolysaccharide-induced increases in cytokines in discrete mouse brain regions are detectable using Luminex xMAP® technology. **Journal of Neuroscience Methods**. 175(1), 119-124, 2008.

D'AFONSECA, V., MORAES, P. M. R. O., PACHECO, L.G.C., MEYER, R., Portela, R.W., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. A description of genes of *Corynebacterium*

*pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. **Genetics and Molecular Research**, v.7, p.252 - 260, 2008.

DE LA BARRERA S, ALEMAN M, MUSELLA R, SCHIERLOH P, PASQUINELLI V, GARCIA V, ABBATE E, SASIAIN MDEL C. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. **Clin Exp Immunol**. Oct;138(1):128-38, 2004.

De ROSE R, TENNENT J, MCWATERS P, CHAPLIN PJ, WOOD PR, KIMPTON W, CAHILL R, SCHEERLINCK JP. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. **Vet Immunol Immunopathol** 90: 55-63, 2002.

DENG Q, HARVIE EA, HUTTENLOCHER A. Distinct signalling mechanisms mediate neutrophil attraction to bacterial infection and tissue injury. **Cell Microbiol**. Apr;14(4):517-28, 2012.

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

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, MS ; BILLAULT, A ; DIAS NETO, E ; SORAVITO, C ; OLIVEIRA, SC ; 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.

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

DUNN, P. L., NORTH, R. J., Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. **Infect. Immun**. 63(9), 3428-3437, 1995.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L. M., e CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

DUTTA, N. K., MAZUMDAR, K., DASGUPTA, A., DASTIDAR, S. G., Activity of the phenothiazine methdilazine alone or in combination with isoniazid or streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Journal of Medical Microbiology**. 58, 1667-1668, 2009.

EDELSON, B. T., BRADSTREET, T. R., HILDNER, K., CARRERO, J. A., FREDERICK, K. E., KC, W., BELIZAIRE, R., AOSHI, T., SCHREIBER, R. D., MILLER, M. J., MURPHY, T. L., UNANUE E. R., MURPHY, K. M., CD8 $\alpha^+$  Dendritic Cells Are an Obligate Cellular Entry Point for Productive Infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity*. 35(2), 236-248, 2011.

EGGLETON DG, MIDDLETON HD, DOIDGE CV, MINTY DW. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J.*, n. 68, p. 317-319, 1991.

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

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

ELLIS JA, HAWK DA, MILLS KW, PRATT DL. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Vet Immunol Immunopathol* 28: 303-316, 1991.

**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)>.

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

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

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

FREDIANI, D.B. Participação da célula B-1 na resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo. **Tese de doutorado** apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2009.

GHOSN, EEB. Revisitando a cavidade peritoneal de camundongos: identificação de novos subtipos funcionais de linfócitos B-1 e macrófagos. **Tese de Doutorado**. São Paulo; s.n; 137[22], 2008.

GOEL, D., BHATNAGAR, R., Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. **Mol. Immun.** 159-168, 2012.

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

GRIFFIN, J. F. A strategic approach to vaccine development: animal models, monitoring vaccine efficacy, formulation and delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, 54(6):851-61, 2002.

GROOT R, VAN BEELEN AJ, BAKDASH G, TAANMAN-KUETER EW, DE JONG EC, KAPSENBERG ML. Viral dsRNA-activated human dendritic cells produce IL-27, which selectively promotes cytotoxicity in naive CD8+ T cells. **J Leukoc Biol.** Jun 13, 2012.

GRUBB, S. C., CHURCHILL, G. A., BOGUE, M. A., A collaborative database of inbred mouse strain characteristics. **Bioinformatics.** 20(16), 2857-2859, 2004.

GURUNATHAN, S.; STOBIE L.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; GLAICHENHAUS, N.; IWASAKI, A.; FOWELL, D. J.; LOCKSLEY, R. M.; CHANG, J. T.; WU, C. Y.; SEDER, R. A. Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. **J Immunol**, 165(2):915-24, 2000.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, 14(2):229-43, 2001.

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

HODGSON AL, CARTER K, TACHEDJIAN M, KRYWULT J, CORNER LA, MCCOLL M, CAMERON A. A Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **J Bacteriol** 17: 802-808, 1999.

HODGSON ALM, KRYWULT J, CORNER LA, ROTHEL JS, RADFORD AJ. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infect Immun** 60: 2900-2905, 1992.

HODGSON ALM, TACHEDJIAN M, CORNER LA, RADFORDT AJ. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine** 62: 5275-5280, 1994.

HOFSTRA, C. L.; VAN ARK, I.; HOFMAN, G.; KOOL, M.; NIJKAMP, F. P.; VAN OOSTERHOUT, A. J.. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. **J. Immunol.** 161: 5054-5060, 1998.

**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. 2012.

IBRAHIM AK, EL-SEEDY FR, HASSAN WH. The role of corynebacterial phospholipase D vaccine in activation of macrophages. **Beni-Suef Vet Med J** 17: 50-55, 2007.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol.Rev.**, 59(4): 533-47, 1995.

JESSE, F.F.A., SANG, S.L., SAHAREE, A.A., SHAHIRUDIN, S. Pathological Changes in the Organs of Mice Model Inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* Organism. **Pertanika J. Trop. Agric. Sci.** 34 (1): 145 – 149, 2011.

JIN, M. C., HUNG, N. D., YOO, J. M., KIM, M. R., SOK, D. Suppressive effect of docosahexaenoyl-lysophosphatidylcholine and 17 hydroxydocosahexaenoyl-lysophosphatidylcholine on levels of cytokines in spleen of mice treated with lipopolysaccharide. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** 114, 114–122, 2012.

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.

KANA, B. D., GORDHAN, B. G., DOWNING, K. J., SUNG, N., VOSTROKTUNOVA, G., MACHOWSKI, E. E., TSENOVA, L., YOUNG, M., KAPRELYANTS, A., KAPLAN, G., MIZHARI, V., The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth *in vitro*. **Molecular Biology.** 67(3), 672-684, 2007.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review of Immunology.** v. 11: p. 129-163, 1993.

KAWAKAMI K, KINJO Y, UEZU K, MIYAGI K, KINJO T, YARA S, KOGUCHI Y, MIYAZATO A, SHIBUYA K, IWAKURA Y, TAKEDA K, AKIRA S, SAITO A. Interferon-gamma production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. **Microbes Infect.** Apr;6(4):339-49, 2004.

KHADER SA, BELL GK, PEARL JE, FOUNTAIN JJ, RANGEL-MORENO J, CILLEY GE, SHEN F, EATON SM, GAFFEN SL, SWAIN SL, LOCKSLEY RM, HAYNES L, RANDALL TD, COOPER AM. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nat Immunol.** Apr;8(4):369-77, 2007.

KHADER, S. A., J. E. PEARL, K. SAKAMOTO, L. GILMARTIN, G. K. BELL, D. M. JELLEY-GIBBS, N. GHILARDI, F. DESAUVAGE, AND A. M. COOPER. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-responses if IL-12p70 is available. **J. Immunol.** 175: 788–795, 2005.

KIMBERLING, C. V. Caseous Lymphadenitis. In: **Jensen and Swift's Diseases of Sheep**. 3.ed. Philadelphia: Lea e Febiger. p. 374-377. 1988.

KIRBY AC, YRLID U, SVENSSON M, WICK MJ. Differential involvement of dendritic cell subsets during acute Salmonella infection. **J. Immunol.** 166:6802-11, 2001.

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

KUTSCHKE L, GANTER M, KABA J. Efficacy of a flock-specific pseudotuberculosis vaccine in goats. **Dtsch Tierarztl Wochenschr** 107: 495-500, 2000.

LAN DT, TANIGUCHI S, MAKINO S, SHIRAHATA T, NAKANE A. Role of endogenous Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 42, p. 863-870, 1998.

LAN DT, MAKINO S, SHIRAHATA T, YAMADA M, NAKANE A. 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.

LEAL I. S., SMEDEGARD B., ANDERSEN P., APPELBERG R. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. **Infect. Immun.** 67:5747-5754, 1999.

LEAMASTER BR, SHEN DT, GORHAM JR, LEATHERS CW, WELLS HD. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. **Am J Vet Res** 48: 869-872, 1987.

LEONARD WJ, SPOLSKI R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. **Nat Rev Immunol.** Sep;5(9):688-98, 2005.

LI Y, BLEAKLEY M, YEE C. IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response. **J Immunol.** Aug 15;175(4):2261-9, 2005.

LIMA, DD. Estudo da Resposta Imune Induzida por Uma Linhagem Atenuada De *Corynebacterium pseudotuberculosis* em Ovinos Criados em Sistema Extensivo. **Dissertação de Mestrado** em Programa de Pós-Graduação em Imunologia - Universidade Federal da Bahia, 2009.

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 Y, MUNKER S, MÜLLENBACH R, WENG HL. IL-13 Signaling in Liver Fibrogenesis. **Front Immunol.** 3:116. 2012.

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.

LONNEMANN G, SHAPIRO L, ENGLER-BLUM G, MÜLLER GA, KOCH KM, DINARELLO CA. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. I. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. **Kidney Int** 47:837–844, 1995.

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, GHILARDI N, LI J, DE SAUVAGE FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. **Proc Natl Acad Sci**. Dec 9;100(25):15047-52, 2003.

LÜTHJE, K., KALLIES, A., SHIMOHAKAMADA, Y., BELZ, G. T., LIGHT, A., TARLINTON, D. M., NUTT, S. L., The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. **Nature Immunology**. 13(5), 491-499, 2011.

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.

MAHON, B. P., SHEAHAN, B. J., GRIFFIN, F., MURPHY, G., MILLS, K. H. G., Atypical diseases after *Bordetella pertussis* respiratory infection of mice with targeted disruptions of interferon- $\gamma$  receptor of immunoglobulin  $\mu$  chain genes. **J. Exp. Med.** 186(11), 1843-1851, 1997.

MATHURIN, K. S., MARTENS, G. W., KORNEFELD, H., WELSH, R. M. CD4 T-cell mediated heterologous immunity between mycobacteria and poxviruses. **Journal of Virology**. 83(8), 3528-3539, 2009.

MAYER, G. Immunology - chapter one: Innate (non-specific) immunity. 2006 Disponível em: < <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter1.htm> > Acesso em: 21 de ago de 2012.

McFARLANE E, CARTER KC, MCKENZIE AN, KAYE PM, BROMBACHER F, ALEXANDER J. Endogenous IL-13 plays a crucial role in liver granuloma maturation during *Leishmania donovani* infection, independent of IL-4R $\alpha$ -responsive macrophages and neutrophils. **J Infect Dis**. Jul 1;204(1):36-43, 2011.

McINNES A, RENNICK DM. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. **J Exp Med**. Feb 1;167(2):598-611, 1988.

McKEAN, S. C., DAVIES, J. K., MOORE, R. J., Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: The major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43°C. **Research in Microbiology**. 158, 279-286, 2007.

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

MEDRANO G, HUNG CA, ALVARADO SA, LIEO. Evaluación de una vacuna contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* en ratones albinos. **Revista de Investigación Veterinaria del Peru** 14: 61-67, 2003.

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

MESSAOUDI, I., PATIÑO, J. A. G., DYALL, R., LEMAOULT, J., NIKOLICH-ZUGICH, J., Direct link between *mhc* polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. **Science**. 298, 1797-1800, 2002.

MEYER R, REGIS L, VALE V, PAULE B, CARMINATI R, BAHIA R, MOURA-COSTA L, SCHAEER R, NASCIMENTO I, FREIRE S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Vet Immunol And Immunopathol**. Sep 15;107(3-4):249-54, 2005.

MEYER R., CARMINATI R., CERQUEIRA R. B., VALE V., VIEGAS S., MARTINEZ T., NASCIMENTO I., SCHAEER R., Da SILVA J. A. H., RIBEIRO M., RÉGIS L., 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, 2002.

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

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.

MINOPRIO, P., BANDEIRA, A., PEREIRA, P., MOTA, S. T. AND COUTINHO, A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. **Int. Immunol**. 1:176, 1989.

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.

MONTGOMERY, D. L.; ULMER J. B.; DONNELLY, J. J.; LIU, M. A.. DNA vaccines. **Pharmacol Ther**, 74(2):195-205, 1997.

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

MOORE, R.J.; ROTHEL, L.; KRYWULT, A.J.; LUND, K.L.; HODGSON, A.L.M. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. **Vaccine**, v. 18, p. 487-497, 2000.

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

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

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

MOURA-COSTA LF, BAHIA RC, CARMINATI R, VALE VL, PAULE BJ, PORTELA RW, FREIRE SM, NASCIMENTO I, SCHAEER R, BARRETO LM, MEYER R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Vet Immunol Immunopathol** 126: 131-141, 2008.

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

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

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

MURPHY, E. A., SATHIYASSELAN, J., PARENT, M. A., ZOU, B., BALDWIN, C. L., Interferon- $\gamma$  is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible Balb/c mice. **Immunology**. 103, 511-518, 2001.

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

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

NARUSE, H., HISAMATSU, T., YAMAUCHI, Y., CHANG, J. E., MATSUOKA, K., KITAZUME, M. T., ARAI, K., ANDO, S., KANAI, T., NAMADA, N., HIBI, T., Intracellular bacteria recognition contributes to maximum interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages. **Clin, Exp. Immunol**. 164, 137-144, 2011.

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

- NEWSOM, D. M., LIGGITT, H. D., O'ROURKE, K., ZHUANG, D., SCHNEIDER, D. A., HARRINGTON, R. D., Cytokine antibody array analysis in brain and periphery of scrapie-infected Tg338 mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 34, 387-397, 2011.
- NIETO, N. C., FOLEY, J. E., MACLACHLAN, N. J., YUAN, T., SPIER, S. J. Evaluation of hepatic disease in mice following intradermal inoculation with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*. 70(2), 257-262, 2009.
- NOLL A, AUTENRIETH IB. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. *Infect Immun*. 64:2955-61, 1996.
- NORMAN MU, ZBYTNUIK L, KUBES P. Interferon-gamma limits Th1 lymphocyte adhesion to inflamed endothelium: a nitric oxide regulatory feedback mechanism. *Eur J Immunol*. May;38(5):1368-80, 2008.
- NORTH, R. J. The concept of the activated macrophage. *The Journal of Immunology*, v. 121, p. 806-809, 1978.
- OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W.; BURET, A.G.; READ, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 86-92, 2002.
- OSWALD, I. P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor  $\alpha$  required as a costimulatory factor for interferon  $\gamma$ -induced activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 89, p. 8676-8680, 1992
- PACHECO LG, CASTRO TL, CARVALHO RD, MORAES PM, DORELLA FA, CARVALHO NB, SLADE SE, SCRIVENS JH, FEELISCH M, MEYER R, MIYOSHI A, OLIVEIRA SC, DOWSON CG, AZEVEDO V. A Role for Sigma Factor  $\sigma(E)$  in *Corynebacterium pseudotuberculosis* Resistance to NitricOx de/Peroxide Stress. *Front Microbiol*. 3:126, 2012.
- PASCUAL C, LAWSON PA, FARROW JA, GIMENEZ MN, COLLINS MD. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol*. v. 45, p. 724-728, 1995.
- PASQUALI, P., THORNTON, A. M., VENDETTI, S., PISTOIA, C., PETRUCCI, P., TARANTINO, M., PESCIAROLI, M., RUGGERI, F., BATTISTONI, A., SHEVACH, E. M., CD4+CD25+ T regulatory cells limit effector T cells and favor the progression of brucellosis in BALB/c mice. *Microbes and Infection*. 12(1), 3-10, 2010.
- PATON, M.W.; WALKER, S.B.; ROSE, I.R.; WATT, G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.*, v. 81, p. 91-95, 2003.
- PAULE BJ, AZEVEDO V, REGIS LF, CARMINATI R, BAHIA CR, VALE VL, MOURA-COSTA LF, FREIRE SM, NASCIMENTO I, SCHAER R, GOES AM, MEYER R.

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

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

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

PEEL, M.M.; 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.

PENN, D. J., DAMJANOVICH, K., POTTS, W. K., MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strains infections. **PNAS**. 99(17), 11260-11264, 2002.

PÉPIN M, CANNELLA D, FONTAINE JJ, PITTET JC, LE PAPE A. Ovine mononuclear phagocytes in situ: identification by monoclonal antibodies and involvement in experimental pyogranulomas. **J Leukoc Biol.** Feb;51(2):188-98, 1992.

PÉPIN M, PARDON P, MARLY J, LANTIER F, ARRIGO JL. Acquired immunity after primary caseous lymphadenitis in sheep. **Am J Vet Res** 54: 873-877, 1993.

PÉPIN M, PARDON P, MARLY J, LANTIER F. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult ewes by inoculation in the external ear. **Am J Vet Res** 49: 459-463, 1988.

PÉPIN M, SEOW HF, CORNER L, ROTHEL JS, HODGSON AL, WOOD PR. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet Res.** 28(2):149-63, 1997.

PÉPIN M., PATON, M. AND HODGSON, A. L. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Current Topics in Veterinary Research**, 1, 63-82, 1994a.

PÉPIN, M., PITTET, J. C., OLIVIER, M. AND GOHIN, I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **Journal of Leukocyte Biology**, 56, 666-670, 1994b.

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

PESTKA S, KRAUSE CD, SARKAR D, WALTER MR, SHI Y, FISHER PB. Interleucina – 10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.22, p.29-70, 2004.

PETER, L. L., ROBLEDO, R. F., BULT, C. J., CHURCHILL, G. A., PAIGEN, B. J., SVENSON, K. L., The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. **Nature Reviews**. 8, 58-69, 2007.

PINHO JMR, DORELLA FA, COELHO KS, FONSECA CT, CARDOSO FC, MEYER R, PORTELA RWD, OLIVEIRA SC, MIYOSHI A, AZEVEDO V, Immunization with Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, But Fails to Confer Protection Against Infection. **The Open Veterinary Science Journal**, 3, 22-27, 2009.

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, BALASHOV KE, STEERE AC, LOGIGIAN EL, HAFLER DA. Identification of a T cell subset capable of both IFN-gamma and IL-10 secretion in patients with chronic *Borrelia burgdorferi* infection. **J. Immunol.** 160: 1804-1810, 1998.

POWRIE, F.; MENON, S.; COFFMAN, R. L.. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. **Eur. J. Immun.**, 23: 2223-2229, 1993.

PRICE, A. E., LIANG, H., SULLIVAN, B. M., REINHARDT, R. L., EISLEY, C. J., ERLE, D. J., LOCKSLEY, R. M., Systematically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. **PNAS**. 107(25), 11489-11494, 2010.

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*. 85 f. **Dissertação de Mestrado em Imunologia** – Instituto de Ciências da saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

REIMAN, R. M., THOMPSON, R. W., FENG, C. G., HARI, D., KNIGHT, R., CHEEVER, A. W., ROSEMBERG, H. F., WYNN, T. A., Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect. Immun.** 74(3), 1471-1479, 2006.

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

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

RIBEIRO OC, SILVA JAH, OLIVEIRA SC, MEYER R, FERNANDES GB. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesq Agropec Bras** 26: 461-465, 1991.

ROACH, D. R., BRISCOE, H., SAUNDERS, B., FRANCE, M. P., RIMINTON, S., BRITTON, W., Secreted lymphotoxin- $\alpha$  essential for the control of an intracellular bacterial infection. **J. Exp. Med.** 193(2), 239-246, 2001.

RODRIGUES MF, BARSANTE MM, ALVES CC, SOUZA MA, FERREIRA AP, AMARANTE-MENDES GP, TEIXEIRA HC. Apoptosis of macrophages during pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels. **Immunology**. Sep;128(1 Suppl):e691-9, 2009.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S., JUNIOR, A. S., SANTOS, A. J., SCHNEIDER, C. Z., CALIXTO, J. B., SOUSA, E. H. S., LOPES, L. G. F., SOUTO, A. A., BASSO, L. A., SANTOS, D. S., CAMPOS, M. M., Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 40, 182-185, 2012.

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

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.

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.

RUIZ JC, D'AFONSECA V, SILVA A, ALI A, PINTO AC, SANTOS AR, ROCHA AA, LOPES DO, DORELLA FA, PACHECO LG, COSTA MP, TURK MZ, SEYFFERT N, MORAES PM, SOARES SC, ALMEIDA SS, CASTRO TL, ABREU VA, TROST E, BAUMBACH J, TAUCH A, SCHNEIDER MP, MCCULLOCH J, CERDEIRA LT, RAMOS RT, ZERLOTINI A, DOMINITINI A, RESENDE DM, COSER EM, OLIVEIRA LM, PEDROSA AL, VIEIRA CU, GUIMARÃES CT, BARTHOLOMEU DC, OLIVEIRA DM, SANTOS FR, RABELO ÉM, LOBO FP, FRANCO GR, COSTA AF, CASTRO IM, DIAS SR, FERRO JA, ORTEGA JM, PAIVA LV, GOULART LR, ALMEIDA JF, FERRO MI, CARNEIRO NP, FALCÃO PR, GRYNBERG P, TEIXEIRA SM, BROMMONSCHENKEL S, OLIVEIRA SC, MEYER R, MOORE RJ, MIYOSHI A, OLIVEIRA GC, AZEVEDO V. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PLoS One**. Apr 18;6(4):e18551, 2011.

OLIVEIRA S. C., SPLITTER G. A., D8+ type 1 CD44(hl) CD45 RB(lo)T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. **European Journal of Immunology**, vol. 25, no. 9, pp. 2551-2557, 1995.

SANTOS, W. R.; PARAGUAI de SOUZA, E.; PALATNIK, M.; PALATNIK de SOUSA, C. B. Vaccination of Swiss Albino mice against experimental visceral leishmaniasis with the FML antigen of *Lishmania donovani*. **Vaccine**. 17: 2554-2561, 1999.

SCHOFIELD, P. N., GRUENBERGER, M., SUNDBERG, J. P., Pathbase and the MPATH ontology: Community resources for mouse histopathology. **Vet. Patho**Nov;47(6):1016-20, 2010.

SELIM SA, GHONEIM ME, MOHAMED KHF. Vaccinal efficacy of genetically inactivated phospholipase D against caseous lymphadenitis in small ruminants. **Int J Microbiol Res** 1: 129-136, 2010.

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.

SHALER, C. R., KUGATHASAN K., MCCORMICK S., DAMJANOVIC D., HORVATH C., SMALL C., JEYANATHAN M., CHEN X., YANG P., XING Z. Pulmonary Mycobacterial Granuloma: Increased IL-10 Production Contributes to Establishing a Symbiotic Host–Microbe Microenvironment. **The American Journal of Pathology**.178(4): 1622–1634, 2011.

SHIBATA, Y., HONDA, I., JUSTICE, J. P., SCOTT, M. R. V., NAKAMURA, R. M., MYRVIK, Q. N., Th1 adjuvant N-acetyl-d-glucosamine polymer up-regulates Th1 immunity but down-regulates Th2 immunity against a mycobacterial protein (MPB-59) in interleukin-10 knockout and wild-type mice. **Infect. Immun.** 69(10), 6123-6130, 2001.

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

SIMMONS C. P.; SARAH J. DUNSTAN, MARY TACHEDJIAN, JOLANTA KRYWULT, ADRIAN L. M. HODGSON, RICHARD A. STRUGNELL. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infect. Immun.**, v.66,n.2, p.474-479, 1998.

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

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

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

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

SOBRINHO, A. G. S. Principais Enfermidades dos Ovinos. In: **Criação de ovinos**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, p.220-221, 2001.

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.

SOUSA, A. O., MAZZACCARO, R. J., RUSSEL, R. G., LEE, F. K., TURNER, O. C., HONG, S., KAER, L. V., BLOOM, B. R., Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. **PNAS**. 97(8), 4204-4208, 2000.

SOUZA, AP. Estudo de aspectos da resposta imune em camundongos CBA infectados com as cepas T1 e VD57 de *Corynebacterium Pseudotuberculosis*. **Dissertação de Mestrado** em Programa de Pós-Graduação em Imunologia - Universidade Federal da Bahia, 2009.

SUNDBERG, B. A., SCHOFIELD, P. N., GRUENBERGER, M., SUNDBERG, J. P., A data-capture tool for mouse pathology phenotyping. **Vet. Patho**. 46, 1230-1240, 2009.

SUNDBERG, J. P., BERNDT, A., SUNDBERG, B. A., SILVA, K. A., KENNEDY, V., PAIGEN, B., HARRISON, D., SCHOFIELD, P. N., The mouse as a model for understanding chronic diseases of aging: the histopathologic basis of aging in inbred mice. **Pathology of Aging and Age-related Diseases**. 1: 7179, 2011.

TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; MOORE, R.J.; HODGSON, A.L.M. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. **Vaccine**, v. 13, p. 1785-1792, 1995.

TAMBOURGI, V.; FERNANDES PEDROSA, M. F.; GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; BILLINGTON, S. J.; GRIFFITHS, S. J.; GRIFFITHS, M.; VAN DEN BERG, C. W. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Molecular Immunology**. 2006.

TANSINI, A., MEDEIROS, M. M., Susceptibility to *Yersinia pseudotuberculosis* infection is linked to the pattern of macrophage activation. **Scandinavian Journal of Immunology**. 69, 310-318, 2009.

TANSINI, A., SILVA, F. F. V., JUNIOR, R. R. S., PLACERES, M. C. P., MEDEIROS, B. M. M., CARLOS, I. Z., Yop effector proteins from *Yersinia pseudotuberculosis* impair dendritic cell activation. **Advances in experimental medicine and biology**. 954(4), 203-208, 2012.

TANTAWICHIEEN, T. Cytokines and Mycobacterial infections. **Division of Infectious Diseases**, Department of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. 1996.

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

TAUCH A, KAISER O, HAIN T, GOESMANN A, WEISSHAAR B, ALBERSMEIER A, BEKEL T, BISCHOFF N, BRUNE I, CHAKRABORTY T, KALINOWSKI J, MEYER F, RUPP O, SCHNEIKER S, VIEHOEVER P, PÜHLER A. A Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. **J Bacteriol** 187: 4671-4682, 2005.

TRIBOUILLARD-TRANVIER, D., STRIEBEL, J. F., PETERSON, K. E., CHESEBRO, B., Analysis of protein levels of 24 cytokines in scrapie agent-infected brain and glial cell cultures from mice differing in prion protein expression levels. **J. Virol.** 83(21), 11244-11253, 2009.

TRINCHIERI, G. Regulatory role of cells producing both interferon  $\gamma$  and interleukin 10 in persistent infection. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 19, 2001.

UMEMURA, M., A. YAHAGI, S. HAMADA, M. D. BEGUM, H. WATANABE, K. KAWAKAMI, T. SUDA, K. SUDO, S. NAKAE, Y. IWAKURA, AND G. MATSUZAKI. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. **J. Immunol.** 178: 3786–3796, 2007.

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

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

VALE, V. 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.

VILLARINO AV, STUMHOFER JS, SARIS CJ, KASTELEIN RA, DE SAUVAGE FJ, HUNTER CA. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. **J Immunol.** Jan 1;176(1):237-47, 2006.

WAHREN, B. & BRYTTING M.. DNA increases the potency of vaccination against infectious diseases. **Curr Opin Chem Biol**, 1(2):183-9, 1997.

WANG, S., FAN, Y., BRUHAN, R. C., YANG, X. INF- $\gamma$  knockout mice show Th-2-associated delayed-type hypersensitivity and the inflammatory cells fail to localize and control chlamydial infection. **Eur. J. Immunol.** 29, 3782-3792, 1999.

WERNECK-BARROSO, E., MOURA, A. C. N., MONTEIRO, M. M., LIMA JÚNIOR, O. M., MEIRELES, M. N. L., HENRIQUES, M. G. M. O., Distinct ability to accumulate

eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. **Inflamm. Res.** 49, 206-213, 2000.

WEST, S. A., BUCKLING, A., Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. **Proc. R. Soc. Lond. B** 270, 37–44, 2002.

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

WINDSOR, P. A., Control of caseous lymphadenitis. **Vet. Clin. Food. Anim.** 27, 193-202, 2011.

WOLFF, H. L. On some spontaneous infections observed in mice: *Corynebacterium kutscheri* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v. 16, n.3, p. 105-110, 1950.

WOLK K, KUNZ S, ASADULLAH K, SABAT R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? **J Immunol.** Jun 1;168(11):5397-402, 2002.

WYNN TA. IL-13 effector functions. **Annu Rev Immunol** 21:425–456, 2003.

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

YANG X, GARTNER J, ZHU L, WANG S, BRUNHAM RC. IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following *Chlamydia trachomatis* lung infection. **J Immunol.** Jan 15;162(2):1010-7, 1999.

YOSHII K, KIM HY, MOTT J, RIKIHISA Y. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. **Infect Immun.** Mar;68(3):1125-33, 2000.

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.

ZENG R, SPOLSKI R, FINKELSTEIN SE, OH S, KOVANEN PE, HINRICHS CS, PISE-MASISON CA, RADONOVICH MF, BRADY JN, RESTIFO NP, BERZOFKY JA, LEONARD WJ. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. **J Exp Med.** Jan 3;201(1):139-48, 2005.

ZHAN Y, CHEERS C. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. **Infect Immun.** Nov;61(11):4899-901, 1993.

ZHAN, Y., LIESCHKE, G. J., GRAIL, D., DUNN, A. R., CHEERS, C., Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. **Blood.** 91(3), 863-869, 1998.

ZHU, Y., LI, X., CHE, C., WANG, F., LI, J., HU, C., LI, Y., MIAO, L., Effects of aluminium trichloride on the trace elements and cytokines in the spleen of rats. **Food and Chemical Toxicology.** 50, 2911-2915, 2012.

**APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Neste apêndice estão agrupadas todas as médias aritméticas com os respectivos desvios padrões ( $X \pm SD$ ) dos experimentos relacionados ao primeiro manuscrito.

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação do peso do Baço de camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	0,3878 ± 0,07963	0,4420 ± 0,1011	0,4170 ± 0,1697	0,4960 0,04669	1,185 0,5983
C57black/6	0,3290 ± 0,06846	0,2982 ± 0,03586	0,2976 ± 0,03454	0,3646 ± 0,05266	0,3664 ± 0,03083
Swiss	0,2444 ± 0,04226	0,2238 ± 0,05080	0,3388 ± 0,1130	0,5560 ± 0,7195	1,207 ± 1,150

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação do peso do Baço de camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	0,2983 ± 0,09190	0,3645 ± 0,06948	0,2918 ± 0,07685	0,3918 ± 0,03164
07 dias	0,2982 ± 0,03586	0,4850 ± 0,08176	0,4708 ± 0,1812	0,3618 ± 0,05268
14 dias	0,2912 ± 0,04885	0,7900 ± 0,0	1,196 ± 0,4170	0,3318 ± 0,05490

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	1,688 ± 0,5784	3,312 ± 1,565	1,538 ± 0,2392	2,266 ± 0,3372	2,700 ± 0,3464
C57black/6	1,888 ± 0,4719	1,640 ± 0,4159	1,786 ± 0,4797	2,872 ± 1,179	2,900 ± 0,5477
Swiss	2,030 ± 0,6579	3,207 ± 1,287	3,594 ± 1,316	6,267 ± 4,706	2,520 ± 1,782

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

Macrófagos	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	0,4956 $\pm$ 0,1024	0,8065 $\pm$ 0,2999	0,4566 $\pm$ 0,06930	0,6099 $\pm$ 0,09849	0,7590 $\pm$ 0,1344
C57black/6	0,6750 $\pm$ 0,1486	0,4936 $\pm$ 0,1730	0,4741 $\pm$ 0,09856	0,6539 $\pm$ 0,3364	0,3864 $\pm$ 0,05773
Swiss	0,3821 $\pm$ 0,1429	0,9278 $\pm$ 0,3923	0,8102 $\pm$ 0,2026	0,9776 $\pm$ 0,9404	0,9797 $\pm$ 0,7796

Linfócitos	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	2,050 $\pm$ 0,5777	1,864 $\pm$ 0,6776	1,040 $\pm$ 0,1617	1,647 $\pm$ 0,2524	1,837 $\pm$ 0,1976
C57black/6	1,750 $\pm$ 0,5666	0,9049 $\pm$ 0,2230	0,9455 $\pm$ 0,3438	2,142 $\pm$ 0,8875	2,423 $\pm$ 0,4927
Swiss	1,715 $\pm$ 0,6812	1,831 $\pm$ 0,6338	2,691 $\pm$ 1,142	2,990 $\pm$ 3,519	1,496 $\pm$ 0,9578

Neutrófilo	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	0,008738 $\pm$ 0,01010	0,6348 $\pm$ 0,6336	0,03899 $\pm$ 0,02749	0,00238 $\pm$ 0,005322	0,09067 $\pm$ 0,06096
C57black/6	0,06856 $\pm$ 0,01413	0,2201 $\pm$ 0,05800	0,3167 $\pm$ 0,05835	0,03884 $\pm$ 0,03282	0,0575 $\pm$ 0,03766
Swiss	0,03166 $\pm$ 0,03294	0,4173 $\pm$ 0,2333	0,05312 $\pm$ 0,04295	0,07540 $\pm$ 0,1537	0,0252 $\pm$ 0,01782

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	2,695 $\pm$ 0,8294	2,078 $\pm$ 0,9778	2,728 $\pm$ 0,6576	1,445 $\pm$ 0,7378
07 dias	5,332 $\pm$ 2,687	14,39 $\pm$ 14,00	30,25 $\pm$ 20,38	1,094 $\pm$ 0,3855
14 dias	2,886 $\pm$ 1,388	18,20 $\pm$ 0,0	6,244 $\pm$ 4,333	2,660 $\pm$ 1,097

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da Determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

Macrófago	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	0,6438 $\pm$ 0,1810	0,5192 $\pm$ 0,3338	0,6584 $\pm$ 0,2062	0,4615 $\pm$ 0,2673
07 dias	0,4936 $\pm$ 0,1730	2,011 $\pm$ 1,932	6,723 $\pm$ 4,156	0,4665 $\pm$ 0,1284
14 dias	1,012 $\pm$ 0,4687	2,184 $\pm$ 0,0	2,054 $\pm$ 1,242	0,8883 $\pm$ 0,4589

Linfócitos	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	1,697 $\pm$ 0,7116	1,478 $\pm$ 0,6821	1,917 $\pm$ 0,4508	0,9213 $\pm$ 0,4622
07 dias	0,9049 $\pm$ 0,2230	4,050 $\pm$ 2,992	11,46 $\pm$ 8,084	0,4856 $\pm$ 0,3000
14 dias	1,439 $\pm$ 0,8975	6,006 $\pm$ 0,0	2,569 $\pm$ 1,851	1,263 $\pm$ 0,5216

Neutrófilos	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	0,06533 $\pm$ 0,01416	0,0612 $\pm$ 0,01880	0,1194 $\pm$ 0,02106	0,04725 $\pm$ 0,02441
07 dias	0,2201 $\pm$ 0,05800	10,24 $\pm$ 8,494	12,07 $\pm$ 8,232	0,1346 $\pm$ 0,05271
14 dias	0,4026 $\pm$ 0,1082	10,01 $\pm$ 0,0	1,612 $\pm$ 1,533	0,4820 $\pm$ 0,1894

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 por células aderentes dos animais *C57Black/6* estimuladas com antígeno secretado da bactéria T1 (TPP):

Citocinas	GC meio	GC TPP	GT1 meio	GT1 TPP
IL-1 $\alpha$	10,48 $\pm$ 18,15	101,1 $\pm$ 90,85	18,68 $\pm$ 17,08	3746 $\pm$ 4529
IL-2	43,07 $\pm$ 86,14	217,9 $\pm$ 19,82	39,24 $\pm$ 87,74	359,7 $\pm$ 264,9
IL-6	157,5 $\pm$ 141,1	2714 $\pm$ 2171	261,3 $\pm$ 265,3	26232 $\pm$ 33508
IL-10	79,95 $\pm$ 64,77	367,1 $\pm$ 202,9	69,21 $\pm$ 68,92	584,6 $\pm$ 346,6
INF- $\gamma$	8,757 $\pm$ 15,17	255,5 $\pm$ 130,2	65,81 $\pm$ 92,09	7330 $\pm$ 14491
TNF- $\alpha$	0,03333 $\pm$ 0,05774	739,2 $\pm$ 648,3	0,0200 $\pm$ 0,04472	3826 $\pm$ 3483
GM-CSF	220,0 $\pm$ 63,06	293,9 $\pm$ 13,62	252,1 $\pm$ 11,81	269,6 $\pm$ 29,85

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 por células aderentes dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10* estimuladas com *C. pseudotuberculosis* viva:

Citocinas	Selv. GC meio	Selv. GC T1	Selv. GT1 meio	Selv. GCT1 T1	KO-INF- $\gamma$ GC meio	KO-INF- $\gamma$ GC T1	KO-INF- $\gamma$ GT1 meio	KO-INF- $\gamma$ GCT1 T1	KO-IL-10 GC meio	KO-IL-10 GC T1	KO-IL-10 GT1 meio	KO-IL-10 GCT1 T1
IL-1 $\alpha$	36,67 $\pm$ 51,85	98,03 $\pm$ 30,41	17,50 $\pm$ 35,01	63,57 $\pm$ 77,76	50,90 $\pm$ 71,98	71,08 $\pm$ 100,5	15,97 $\pm$ 35,72	65,81 $\pm$ 50,83	0,0 $\pm$ 0,0	19,71 $\pm$ 27,87	13,95 $\pm$ 31,18	69,00 $\pm$ 49,06
IL-2	0,050 $\pm$ 0,0707	132,0 $\pm$ 186,6	65,98 $\pm$ 132,0	223,2 $\pm$ 258,4	154,1 $\pm$ 217,9	199,8 $\pm$ 282,6	50,34 $\pm$ 112,6	151,4 $\pm$ 207,5	0,050 $\pm$ 0,0707	187,1 $\pm$ 264,6	57,41 $\pm$ 128,4	181,8 $\pm$ 178,8
IL-6	279,5 $\pm$ 13,56	443,7 $\pm$ 12,39	346,8 $\pm$ 122,3	397,1 $\pm$ 15,24	408,2 $\pm$ 12,60	619,9 $\pm$ 249,2	356,4 $\pm$ 207,1	2096 $\pm$ 2815	416,4 $\pm$ 234,7	626,6 $\pm$ 398,1	350,5 $\pm$ 191,6	455,7 $\pm$ 179,1
IL-10	41,68 $\pm$ 14,67	172,6 $\pm$ 95,47	0,002 $\pm$ 0,0005	35,81 $\pm$ 38,45	12,50 $\pm$ 17,68	21,50 $\pm$ 30,41	10,41 $\pm$ 18,04	40,99 $\pm$ 77,89	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
INF- $\gamma$	0,050 $\pm$ 0,0707	138,0 $\pm$ 195,2	60,62 $\pm$ 105,0	439,9 $\pm$ 401,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,002 $\pm$ 0,0004	227,3 $\pm$ 240,4
TNF- $\alpha$	51,90 $\pm$ 41,27	139,5 $\pm$ 89,88	23,47 $\pm$ 31,06	240,1 $\pm$ 127,2	24,13 $\pm$ 1,994	129,5 $\pm$ 57,56	19,69 $\pm$ 19,04	229,4 $\pm$ 105,4	0,050 $\pm$ 0,0707	11,36 $\pm$ 16,07	13,78 $\pm$ 14,06	43,94 $\pm$ 26,77
GM-CSF	50,20 $\pm$ 70,99	52,67 $\pm$ 74,48	76,27 $\pm$ 125,4	81,50 $\pm$ 105,2	0,050 $\pm$ 0,0707	106,3 $\pm$ 71,15	0,025 $\pm$ 0,0500	56,59 $\pm$ 71,06	0,050 $\pm$ 0,0707	52,67 $\pm$ 74,48	0,020 $\pm$ 0,0447	175,9 $\pm$ 96,47
IL-17	125,3 $\pm$ 93,28	146,7 $\pm$ 20,03	159,2 $\pm$ 31,91	184,4 $\pm$ 24,97	0,050 $\pm$ 0,0707	131,1 $\pm$ 60,82	43,63 $\pm$ 69,33	168,4 $\pm$ 51,82	223,5 $\pm$ 114,9	230,8 $\pm$ 12,50	218,6 $\pm$ 63,29	222,1 $\pm$ 33,97

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

MIF – CD4	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	1191 $\pm$ 326,3	864,3 $\pm$ 273,8	560,2 $\pm$ 455,1	1272 $\pm$ 116,0	855,9 $\pm$ 384,4
C57black/6	1668 $\pm$ 365,1	1514 $\pm$ 137,5	1442 $\pm$ 406,0	1812 $\pm$ 281,6	1493 $\pm$ 24,02
Swiss	742,9 $\pm$ 358,1	667,6 $\pm$ 73,55	635,2 $\pm$ 65,19	1619 $\pm$ 125,9	1108 $\pm$ 276,3

MIF – CD8	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	1654 $\pm$ 288,1	2162 $\pm$ 117,6	1382 $\pm$ 252,6	1630 $\pm$ 84,74	1666 $\pm$ 1149
C57black/6	1722 $\pm$ 559,6	2692 $\pm$ 531,7	1479 $\pm$ 868,7	1657 $\pm$ 420,1	1943 $\pm$ 51,96
Swiss	1167 $\pm$ 516,5	1582 $\pm$ 100,9	1553 $\pm$ 112,0	1858 $\pm$ 107,1	1878 $\pm$ 73,32

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

MIF – CD4	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	1227 $\pm$ 296,0	1964 $\pm$ 184,2	1376 $\pm$ 298,0	1262 $\pm$ 94,31
07 dias	1514 $\pm$ 137,5	1839 $\pm$ 54,56	1576 $\pm$ 53,39	1188 $\pm$ 75,25
14 dias	1333 $\pm$ 30,40	1783 $\pm$ 0,0	1176 $\pm$ 69,42	1316 $\pm$ 30,99

MIF – CD8	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	2359 $\pm$ 223,0	2212 $\pm$ 569,8	2990 $\pm$ 345,7	1824 $\pm$ 543,4
07 dias	2692 $\pm$ 531,7	1829 $\pm$ 270,0	2720 $\pm$ 377,9	2051 $\pm$ 479,4
14 dias	2906 $\pm$ 129,2	2183 $\pm$ 0,0	2043 $\pm$ 754,1	1516 $\pm$ 47,20

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

TNF- $\alpha$	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	101,5 $\pm$ 43,44	60,26 $\pm$ 41,38	52,02 $\pm$ 48,40
07 dias	79,74 $\pm$ 13,10	72,02 $\pm$ 9,067	19,00 $\pm$ 17,69
30 dias	93,56 $\pm$ 34,93	61,82 $\pm$ 15,20	44,20 $\pm$ 42,80
60 dias	82,52 $\pm$ 29,63	91,21 $\pm$ 32,10	8,800 $\pm$ 14,74
120 dias	112,7 $\pm$ 14,75	84,77 $\pm$ 57,42	137,7 $\pm$ 42,73

IL-1 $\alpha$	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	140,4 $\pm$ 88,48	133,6 $\pm$ 36,70	124,5 $\pm$ 66,64
07 dias	160,8 $\pm$ 30,70	174,8 $\pm$ 27,49	111,4 $\pm$ 31,71
30 dias	197,6 $\pm$ 64,58	173,4 $\pm$ 20,29	148,4 $\pm$ 18,92
60 dias	239,6 $\pm$ 19,91	134,8 $\pm$ 36,91	104,7 $\pm$ 33,41
120 dias	252,7 $\pm$ 103,2	239,4 $\pm$ 150,4	159,2 $\pm$ 35,43

IL-6	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	15,10 $\pm$ 28,27	10,87 $\pm$ 23,90	10,10 $\pm$ 21,66
07 dias	21,32 $\pm$ 31,45	2,000 $\pm$ 4,472	2,000 $\pm$ 4,472
30 dias	42,93 $\pm$ 43,05	5,630 $\pm$ 12,59	13,34 $\pm$ 29,83
60 dias	13,21 $\pm$ 18,09	32,86 $\pm$ 30,94	4,000 $\pm$ 8,944
120 dias	34,02 $\pm$ 40,95	68,72 $\pm$ 77,66	45,87 $\pm$ 64,87

INF- $\gamma$	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	110,0 $\pm$ 92,59	63,95 $\pm$ 69,07	72,52 $\pm$ 15,97
07 dias	93,66 $\pm$ 47,18	50,11 $\pm$ 51,24	42,60 $\pm$ 30,80
30 dias	114,0 $\pm$ 65,58	73,02 $\pm$ 57,32	39,40 $\pm$ 30,01
60 dias	83,96 $\pm$ 54,71	105,0 $\pm$ 72,42	48,80 $\pm$ 26,88
120 dias	191,9 $\pm$ 97,58	232,9 $\pm$ 171,0	137,7 $\pm$ 42,73

IL-17	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	96,98 $\pm$ 25,26	85,62 $\pm$ 15,29	78,99 $\pm$ 11,83
07 dias	108,3 $\pm$ 22,04	100,5 $\pm$ 24,41	71,86 $\pm$ 58,33
30 dias	103,7 $\pm$ 29,94	85,82 $\pm$ 15,86	40,60 $\pm$ 31,28
60 dias	104,9 $\pm$ 27,75	95,53 $\pm$ 23,93	53,97 $\pm$ 42,14
120 dias	107,1 $\pm$ 8,092	86,17 $\pm$ 62,92	141,1 $\pm$ 8,839

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

IL-10	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	48,13 $\pm$ 43,19	58,59 $\pm$ 35,17	48,71 $\pm$ 39,23
07 dias	48,38 $\pm$ 23,30	52,68 $\pm$ 16,13	49,21 $\pm$ 6,438
30 dias	74,22 $\pm$ 49,90	52,31 $\pm$ 37,97	36,28 $\pm$ 24,96
60 dias	50,46 $\pm$ 27,98	91,04 $\pm$ 54,45	3,716 $\pm$ 4,146
120 dias	85,65 $\pm$ 42,41	78,14 $\pm$ 84,88	65,00 $\pm$ 25,65

IL-13	Balb/c	C57Black/6	Swiss
Controle	1,250 $\pm$ 3,536	15,75 $\pm$ 44,54	10,74 $\pm$ 25,63
07 dias	181,0 $\pm$ 404,8	69,56 $\pm$ 78,00	69,44 $\pm$ 63,46
30 dias	28,20 $\pm$ 63,06	33,42 $\pm$ 74,73	2,400 $\pm$ 5,367
60 dias	2,000 $\pm$ 4,472	16,68 $\pm$ 22,86	2,400 $\pm$ 5,367
120 dias	55,58 $\pm$ 124,3	15,18 $\pm$ 33,95	0,0010 $\pm$ 0,001414

IL-5	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	24,70 $\pm$ 46,45	10,90 $\pm$ 30,43	31,53 $\pm$ 50,59
07 dias	98,34 $\pm$ 184,6	88,12 $\pm$ 83,94	29,94 $\pm$ 66,96
30 dias	65,12 $\pm$ 61,10	32,10 $\pm$ 71,79	29,96 $\pm$ 66,99
60 dias	43,18 $\pm$ 62,29	151,3 $\pm$ 87,06	4,000 $\pm$ 8,944
120 dias	90,96 $\pm$ 106,1	13,07 $\pm$ 29,22	67,96 $\pm$ 96,11

<b>IL-4</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	102,5 ± 50,00	107,8 ± 37,12	91,61 ± 28,01
07 dias	122,0 ± 24,78	128,2 ± 29,85	105,6 ± 18,68
30 dias	130,5 ± 55,33	108,7 ± 14,40	101,0 ± 35,92
60 dias	122,7 ± 37,24	127,7 ± 28,04	53,80 ± 45,09
120 dias	160,2 ± 40,04	118,1 ± 91,09	138,3 ± 8,620

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57black/6* e *Swiss*:

<b>IL-2</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	45,89 ± 44,90	93,71 ± 67,38	36,74 ± 52,69
07 dias	83,86 ± 87,23	94,44 ± 72,35	48,49 ± 57,24
30 dias	133,9 ± 49,10	105,4 ± 64,82	46,76 ± 65,54
60 dias	59,90 ± 59,13	93,36 ± 78,22	88,78 ± 81,30
120 dias	136,6 ± 121,1	91,33 ± 99,94	151,7 ± 46,77

<b>IL-21</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	391,1 ± 57,21	342,8 ± 190,6	364,2 ± 128,5
07 dias	418,7 ± 206,1	348,6 ± 114,6	282,8 ± 97,10
30 dias	452,2 ± 156,0	353,9 ± 108,8	205,9 ± 190,9
60 dias	344,8 ± 103,5	387,4 ± 55,18	207,4 ± 134,2
120 dias	327,1 ± 231,3	304,2 ± 181,4	406,7 ± 77,17

<b>IL-22</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	10,19 ± 7,897	9,460 ± 5,155	9,431 ± 8,370
07 dias	14,73 ± 5,798	14,23 ± 6,416	10,18 ± 7,028
30 dias	17,14 ± 13,88	12,92 ± 8,431	4,980 ± 7,294
60 dias	20,54 ± 5,190	13,07 ± 8,038	8,182 ± 4,906
120 dias	17,07 ± 5,872	19,42 ± 11,75	20,45 ± 6,640

<b>IL-27</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	273,0 ± 124,8	188,6 ± 28,93	204,4 ± 40,75
07 dias	237,4 ± 53,11	215,0 ± 55,30	119,9 ± 68,91
30 dias	243,7 ± 62,28	174,0 ± 23,61	101,6 ± 38,14
60 dias	253,1 ± 54,18	221,6 ± 61,51	74,03 ± 44,67
120 dias	298,9 ± 33,71	680,3 ± 745,6	306,2 v 35,83

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	226,2 $\pm$ 52,30	284,3 $\pm$ 72,55	254,6 $\pm$ 24,05	297,4 $\pm$ 40,02
07 dias	244,4 $\pm$ 18,44	302,9 $\pm$ 85,60	253,7 $\pm$ 26,33	262,6 $\pm$ 11,12
14 dias	292,7 $\pm$ 44,75	268,2 $\pm$ 0,0	221,9 $\pm$ 15,76	304,4 $\pm$ 59,46

<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	647,9 $\pm$ 13,43	643,4 $\pm$ 37,62	623,7 $\pm$ 19,40	679,1 $\pm$ 16,97
07 dias	624,8 $\pm$ 29,40	722,3 $\pm$ 159,7	620,9 $\pm$ 18,34	749,5 $\pm$ 100,4
14 dias	639,3 $\pm$ 16,78	643,5 $\pm$ 0,0	692,0 $\pm$ 49,13	714,9 $\pm$ 101,3

<b>IL-6</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	310,2 $\pm$ 43,02	306,2 $\pm$ 79,69	337,7 $\pm$ 81,45	340,4 $\pm$ 91,96
07 dias	286,5 $\pm$ 50,21	862,1 $\pm$ 829,4	332,6 $\pm$ 38,19	399,7 $\pm$ 66,81
14 dias	371,5 $\pm$ 60,55	305,6 $\pm$ 0,0	305,2 $\pm$ 61,03	408,0 $\pm$ 136,2

<b>INF-<math>\gamma</math></b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	376,9 $\pm$ 41,28	403,3 $\pm$ 32,70	Não avaliado	459,1 $\pm$ 31,16
07 dias	393,4 $\pm$ 21,80	633,0 $\pm$ 486,7	Não avaliado	674,1 $\pm$ 380,7
14 dias	397,5 $\pm$ 30,87	406,0 $\pm$ 0,0	Não avaliado	747,4 $\pm$ 664,9

<b>IL-17</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	206,4 $\pm$ 57,84	213,0 $\pm$ 26,80	257,4 $\pm$ 68,32	254,1 $\pm$ 58,39
07 dias	190,4 $\pm$ 35,66	242,4 $\pm$ 73,54	246,9 $\pm$ 16,72	199,2 $\pm$ 23,78
14 dias	243,0 $\pm$ 48,83	194,2 $\pm$ 0,0	207,8 $\pm$ 27,89	246,5 $\pm$ 57,81

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

<b>IL-10</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	302,8 $\pm$ 136,0	346,1 $\pm$ 150,2	365,8 $\pm$ 191,1	Não avaliado
07 dias	247,3 $\pm$ 96,53	237,8 $\pm$ 139,7	323,9 $\pm$ 75,57	Não avaliado
14 dias	374,2 $\pm$ 104,2	414,4 $\pm$ 0,0	287,9 $\pm$ 92,81	Não avaliado

<b>IL-13</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	636,6 ± 165,9	638,9 ± 138,8	554,6 ± 133,4	581,0 ± 150,9
07 dias	445,8 ± 40,09	1230 ± 1632	561,1 ± 57,17	486,8 ± 42,71
14 dias	620,3 ± 90,28	511,7 ± 0,0	476,3 ± 117,7	586,9 ± 100,2

<b>IL-5</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	359,4 ± 67,31	384,1 ± 75,46	381,7 ± 72,54	479,4 ± 57,28
07 dias	340,6 ± 61,49	305,2 ± 195,7	386,9 ± 104,3	402,7 ± 68,16
14 dias	421,7 ± 62,54	387,9 ± 0,0	331,9 ± 59,91	451,2 ± 71,56

<b>IL-4</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	296,4 ± 52,59	297,4 ± 52,26	271,4 ± 63,09	350,3 ± 71,25
07 dias	249,5 ± 32,31	303,4 ± 122,1	305,4 ± 27,29	284,6 ± 28,22
14 dias	320,6 ± 75,75	279,0 ± 0,0	254,5 ± 24,13	333,7 ± 57,70

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

<b>IL-2</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	549,1 ± 86,42	580,4 ± 67,32	613,7 ± 43,10	613,9 ± 90,67
07 dias	519,6 ± 32,10	427,3 ± 240,4	616,9 ± 55,71	558,4 ± 31,65
14 dias	616,9 ± 47,90	554,1 ± 0,0	561,2 ± 22,60	616,5 ± 32,33

<b>IL-21</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	348,3 ± 136,0	428,6 ± 219,5	457,6 ± 272,5	470,3 ± 371,5
07 dias	266,0 ± 144,1	260,7 ± 160,9	307,6 ± 189,1	276,3 ± 82,43
14 dias	460,8 ± 268,7	292,0 ± 0,0	135,2 ± 62,95	398,0 ± 283,1

<b>IL-22</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	48,06 ± 6,265	48,42 ± 4,132	53,95 ± 8,809	54,93 ± 14,02
07 dias	45,95 ± 3,628	51,61 ± 7,541	52,56 ± 8,070	48,62 ± 5,173
14 dias	58,64 ± 9,322	46,02 ± 0,0	46,93 ± 4,995	55,71 ± 11,36

<b>IL-27</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	1194 ± 175,7	1322 ± 71,97	1268 ± 200,0	1458 ± 137,2
07 dias	1224 ± 63,11	1895 ± 1293	1220 ± 168,9	1318 ± 92,89
14 dias	1296 ± 141,6	1336 ± 0,0	1279 ± 159,5	1444 ± 144,1

## APÊNDICE B

Neste apêndice estão agrupadas todas as médias aritméticas com os respectivos desvios padrões ( $X \pm SD$ ) dos experimentos relacionados ao segundo manuscrito.

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação do peso do Baço de camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	0,3878 ± 0,07963	0,3660 ± 0,06025	0,4792 ± 0,1777	0,4380 ± 0,09203	0,4662 ± 0,02718
C57black/6	0,3290 ± 0,06846	0,3542 ± 0,04758	0,3544 ± 0,08027	0,4034 ± 0,1063	0,3300 ± 0,04791
Swiss	0,2444 ± 0,04226	0,2632 ± 0,06230	0,3465 ± 0,1674	0,4300 ± 0,3264	0,2955 ± 0,08967

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	1,688 ± 0,5784	3,106 ± 0,6864	2,282 ± 0,5182	1,466 ± 0,3204	6,120 ± 2,114
C57black/6	1,888 ± 0,4719	2,040 ± 0,5505	1,740 ± 0,2720	2,954 ± 0,9513	3,576 ± 0,8088
Swiss	2,030 ± 0,6579	3,378 ± 1,644	6,120 ± 2,088	10,90 ± 6,477	5,538 ± 1,465

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos *Balb/c*, *C57black/6* e *Swiss*:

Macrófagos	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	0,4956 ± 0,1024	0,6267 ± 0,2036	0,8241 ± 0,3461	0,4090 ± 0,1342	1,119 ± 0,2322
C57black/6	0,6750 ± 0,1486	0,7723 ± 0,1384	0,3522 ± 0,03608	0,7516 ± 0,2656	0,5687 ± 0,1027
Swiss	0,3821 ± 0,1429	1,157 ± 0,6366	1,648 ± 0,4330	2,675 ± 1,979	1,498 ± 0,1371

Linfócitos	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	2,050 ± 0,5777	2,420 ± 0,7233	1,391 ± 0,4182	1,009 ± 0,2176	4,905 ± 2,094
C57black/6	1,750 ± 0,5666	0,9683 ± 0,3447	1,082 ± 0,2004	2,154 ± 0,8081	2,938 ± 0,6956
Swiss	1,715 ± 0,6812	1,529 ± 0,7880	4,178 ± 1,845	7,798 ± 4,414	3,847 ± 1,315

Neutrófilo	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	0,008738 ± 0,01010	0,05905 ± 0,03621	0,06524 ± 0,03829	0,0460 ± 0,01683	0,0953 ± 0,1001
C57black/6	0,06856 ± 0,01413	0,2731 ± 0,1368	0,2426 ± 0,04734	0,02116 ± 0,01572	0,0399 ± 0,02977
Swiss	0,03166 ± 0,03294	0,6904 ± 0,3785	0,2097 ± 0,2496	0,04626 ± 0,04456	0,0160 ± 0,0320

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 por células aderentes dos animais *C57Black/6* estimuladas com antígeno secretado da bactéria T1 (TPP):

Citocinas	GC meio	GC TPP	GC57 meio	GC57 TPP
IL-1 $\alpha$	10,48 ± 18,15	101,1 ± 90,85	22,28 ± 13,89	2932 ± 3957
IL-2	43,07 ± 86,14	217,9 ± 19,82	141,3 ± 130,4	228,5 ± 75,40
IL-6	157,5 ± 141,1	2714 ± 2171	195,0 ± 181,8	21203 ± 27554
IL-10	79,95 ± 64,77	367,1 ± 202,9	75,77 ± 71,12	531,4 ± 341,7
INF- $\gamma$	8,757 ± 15,17	255,5 ± 130,2	70,38 ± 68,40	1321 ± 1909
TNF- $\alpha$	0,03333 ± 0,05774	739,2 ± 648,3	0,0200 ± 0,04472	3733 ± 3425
GM-CSF	220,0 ± 63,06	293,9 ± 13,62	274,9 ± 21,36	332,6 ± 24,93

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

MIF – CD4	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	1191 ± 326,3	1110 ± 236,4	929,3 ± 585,5	1134 ± 56,12	945,5 ± 10,08
C57black/6	1668 ± 365,1	1406 ± 229,8	1201 ± 663,3	1939 ± 130,6	1463 ± 64,63
Swiss	917,9 ± 513,7	784,9 ± 85,66	704,1 ± 28,65	1698 ± 87,97	1416 ± 63,79

MIF – CD8	Controle	07 dias	30 dias	60 dias	120 dias
Balb/c	1992 ± 457,1	2213 ± 151,6	1642 ± 270,5	1456 ± 166,2	2860 ± 15,87
C57black/6	1721 ± 559,3	2687 ± 593,7	1204 ± 922,3	1473 ± 104,2	1927 ± 93,71
Swiss	1530 ± 695,9	855,7 ± 230,6	558,9 ± 194,5	1881 ± 330,5	2170 ± 218,2

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

TNF- $\alpha$	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	101,5 ± 43,44	60,26 ± 41,38	52,02 ± 48,40
07 dias	87,36 ± 19,21	77,94 ± 13,30	14,60 ± 4,827
30 dias	67,62 ± 46,24	54,39 ± 39,12	16,40 ± 3,647
60 dias	99,18 ± 7,975	62,30 ± 22,11	62,14 ± 25,44
120 dias	69,90 ± 43,65	99,98 ± 62,43	58,95 ± 48,59

IL-1 $\alpha$	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	140,4 ± 88,48	133,6 ± 36,70	124,5 ± 66,64
07 dias	236,0 ± 90,06	189,8 ± 63,11	102,1 ± 21,97
30 dias	238,3 ± 47,66	179,4 ± 18,56	134,9 ± 35,20
60 dias	322,3 ± 49,05	123,9 ± 22,40	160,2 ± 138,0
120 dias	404,0 ± 131,9	257,0 ± 34,19	132,7 ± 107,9

IL-6	Balb/C	C57Black/6	Swiss
Controle	15,10 ± 28,27	10,87 ± 23,90	10,10 ± 21,66
07 dias	54,01 ± 40,01	13,02 ± 21,44	2,000 ± 4,472
30 dias	17,42 ± 25,75	2,000 ± 4,472	9,342 ± 20,89
60 dias	45,05 ± 34,99	11,12 ± 24,86	4,000 ± 8,944
120 dias	31,98 ± 45,18	68,72 ± 77,66	23,20 ± 26,81

<b>INF-<math>\gamma</math></b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	110,0 $\pm$ 92,59	63,95 $\pm$ 69,07	72,52 $\pm$ 15,97
07 dias	115,7 $\pm$ 38,87	124,0 $\pm$ 14,51	35,40 $\pm$ 14,62
30 dias	114,1 $\pm$ 74,95	27,81 $\pm$ 42,14	32,80 $\pm$ 15,22
60 dias	134,7 $\pm$ 33,02	40,85 $\pm$ 38,07	223,6 $\pm$ 247,3
120 dias	122,5 $\pm$ 44,13	179,2 $\pm$ 81,88	61,42 $\pm$ 75,23

<b>IL-17</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	96,98 $\pm$ 25,26	85,62 $\pm$ 15,29	78,99 $\pm$ 11,83
07 dias	105,7 $\pm$ 12,23	95,21 $\pm$ 12,48	67,86 $\pm$ 52,92
30 dias	92,69 $\pm$ 58,65	61,10 $\pm$ 26,64	30,53 $\pm$ 22,77
60 dias	115,8 $\pm$ 19,66	95,05 $\pm$ 10,16	101,4 $\pm$ 16,41
120 dias	85,34 $\pm$ 6,643	50,54 $\pm$ 52,54	83,04 $\pm$ 61,62

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

<b>IL-10</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	48,13 $\pm$ 43,19	58,59 $\pm$ 35,17	48,71 $\pm$ 39,23
07 dias	60,09 $\pm$ 28,62	23,49 $\pm$ 16,96	41,88 $\pm$ 16,89
30 dias	44,51 $\pm$ 33,07	54,95 $\pm$ 11,28	38,03 $\pm$ 22,56
60 dias	73,91 $\pm$ 29,93	63,41 $\pm$ 23,52	60,22 $\pm$ 70,19
120 dias	96,94 $\pm$ 52,40	38,37 $\pm$ 44,39	33,38 $\pm$ 24,99

<b>IL-13</b>	<b>Balb/c</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	1,250 $\pm$ 3,536	15,75 $\pm$ 44,54	10,74 $\pm$ 25,63
07 dias	4,760 $\pm$ 10,64	35,46 $\pm$ 69,43	20,80 $\pm$ 20,66
30 dias	60,07 $\pm$ 134,3	25,04 $\pm$ 55,98	2,400 $\pm$ 5,367
60 dias	70,51 $\pm$ 97,38	43,26 $\pm$ 62,03	2,400 $\pm$ 5,367
120 dias	21,86 $\pm$ 30,05	437,8 $\pm$ 423,5	0,003333 $\pm$ 0,005774

<b>IL-5</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	24,70 $\pm$ 46,45	10,90 $\pm$ 30,43	31,53 $\pm$ 50,59
07 dias	144,9 $\pm$ 87,38	43,82 $\pm$ 97,99	27,40 $\pm$ 61,28
30 dias	62,12 $\pm$ 90,15	21,15 $\pm$ 47,28	0,0 $\pm$ 0,0
60 dias	78,71 $\pm$ 79,93	70,11 $\pm$ 68,42	18,54 $\pm$ 41,45
120 dias	97,19 $\pm$ 93,56	2,000 $\pm$ 4,472	31,67 $\pm$ 63,34

<b>IL-4</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	102,5 ± 50,00	107,8 ± 37,12	91,61 ± 28,01
07 dias	130,2 ± 9,484	116,7 ± 21,04	105,6 ± 18,68
30 dias	103,6 ± 61,66	64,54 ± 80,86	101,0 ± 35,92
60 dias	143,3 ± 31,14	131,8 ± 21,93	97,74 ± 56,11
120 dias	111,8 ± 40,96	138,1 ± 127,2	90,45 ± 67,22

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*, *C57Black/6* e *Swiss*:

<b>IL-2</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	45,89 ± 44,90	93,71 ± 67,38	36,74 ± 52,69
07 dias	80,94 ± 85,60	98,78 ± 66,64	27,35 ± 61,16
30 dias	163,5 ± 96,99	46,84 ± 64,30	36,61 ± 54,41
60 dias	164,6 ± 62,41	132,7 ± 71,66	153,6 ± 61,75
120 dias	111,7 ± 84,37	107,5 ± 62,86	113,2 ± 83,36

<b>IL-21</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	391,1 ± 57,21	342,8 ± 190,6	364,2 ± 128,5
07 dias	320,4 ± 101,9	350,9 ± 45,66	180,1 ± 159,1
30 dias	239,7 ± 137,8	306,4 ± 122,8	339,2 ± 63,49
60 dias	375,0 ± 172,2	366,7 ± 111,5	414,1 ± 49,68
120 dias	310,7 ± 259,5	245,9 ± 420,1	265,7 ± 203,0

<b>IL-22</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	10,19 ± 7,897	9,460 ± 5,155	9,431 ± 8,370
07 dias	14,20 ± 6,223	7,806 ± 7,670	3,142 ± 4,361
30 dias	13,61 ± 8,027	0,7820 ± 1,749	2,946 ± 4,982
60 dias	16,26 ± 6,126	13,71 ± 7,892	14,71 ± 4,741
120 dias	16,00 ± 5,649	29,97 ± 25,26	10,08 ± 12,16

<b>IL-27</b>	<b>Balb/C</b>	<b>C57Black/6</b>	<b>Swiss</b>
Controle	273,0 ± 124,8	188,6 ± 28,93	204,4 ± 40,75
07 dias	272,8 ± 45,44	227,6 ± 35,57	125,4 ± 23,90
30 dias	241,2 ± 52,87	146,1 ± 51,54	145,9 ± 25,74
60 dias	273,0 ± 34,19	230,0 ± 56,93	203,2 ± 33,10
120 dias	268,6 ± 37,97	395,6 ± 77,61	250,0 ± 80,29

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação do peso do Baço de camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

	<b>Selvagem</b>	<b>KO-ON</b>	<b>KO-INF-<math>\gamma</math></b>	<b>KO-IL-10</b>
Controle	0,2983 $\pm$ 0,09190	0,3645 $\pm$ 0,06948	0,2918 $\pm$ 0,07685	0,3918 $\pm$ 0,03164
07 dias	0,3542 $\pm$ 0,04758	0,3416 $\pm$ 0,04783	0,3494 $\pm$ 0,03158	0,3682 $\pm$ 0,1248
14 dias	0,2778 $\pm$ 0,01303	0,3314 $\pm$ 0,04093	0,3050 $\pm$ 0,02284	0,4172 $\pm$ 0,04684

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da quantidade leucocitária total nos camundongos *C57Black/6*selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

	<b>Selvagem</b>	<b>KO-ON</b>	<b>KO-INF-<math>\gamma</math></b>	<b>KO-IL-10</b>
Controle	2,695 $\pm$ 0,8294	2,078 $\pm$ 0,9778	2,728 $\pm$ 0,6576	1,445 $\pm$ 0,7378
07 dias	5,332 $\pm$ 2,687	2,084 $\pm$ 0,7826	6,188 $\pm$ 1,847	2,010 $\pm$ 1,351
14 dias	2,886 $\pm$ 1,388	5,252 $\pm$ 2,951	2,730 $\pm$ 1,672	2,442 $\pm$ 0,3291

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da Determinação da contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

<b>Macrófago</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO-ON</b>	<b>KO-INF-<math>\gamma</math></b>	<b>KO-IL-10</b>
Controle	0,6438 $\pm$ 0,1810	0,5192 $\pm$ 0,3338	0,6584 $\pm$ 0,2062	0,4615 $\pm$ 0,2673
07 dias	0,7723 $\pm$ 0,1384	0,3650 $\pm$ 0,1121	1,149 $\pm$ 0,5142	0,7669 $\pm$ 0,5888
14 dias	1,123 $\pm$ 0,7044	1,239 $\pm$ 1,045	0,6608 $\pm$ 0,4592	0,8563 $\pm$ 0,08751

<b>Linfócitos</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO-ON</b>	<b>KO-INF-<math>\gamma</math></b>	<b>KO-IL-10</b>
Controle	1,697 $\pm$ 0,7116	1,478 $\pm$ 0,6821	1,917 $\pm$ 0,4508	0,9213 $\pm$ 0,4622
07 dias	0,9683 $\pm$ 0,3447	1,437 $\pm$ 0,5566	4,011 $\pm$ 0,9468	0,9646 $\pm$ 0,6412
14 dias	1,454 $\pm$ 1,135	3,052 $\pm$ 1,466	1,703 $\pm$ 1,169	1,132 $\pm$ 0,3529

Neutrófilos	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	0,06533 $\pm$ 0,01416	0,0612 $\pm$ 0,01880	0,1194 $\pm$ 0,02106	0,04725 $\pm$ 0,02441
07 dias	0,2731 $\pm$ 0,1368	0,2572 $\pm$ 0,09460	0,9548 $\pm$ 0,4050	0,2673 $\pm$ 0,1403
14 dias	0,4652 $\pm$ 0,2911	0,7513 $\pm$ 0,5148	0,3242 $\pm$ 0,1373	0,4259 $\pm$ 0,09204

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , GMC-SF, IL-10, IL-6, IL-2 e IL-17 por células aderentes dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10* estimuladas com *C. pseudotuberculosis* viva:

Citocinas	Selv. GC meio	Selv. GC C57	Selv. GC57 meio	Selv. GC57 C57	KO-ON GC meio	KO-ON GC C57	KO-ON GC57 meio	KO-ON GC57 C57
IL-1 $\alpha$	36,67 $\pm$ 51,85	83,20 $\pm$ 9,475	17,50 $\pm$ 35,01	56,48 $\pm$ 39,07	43,14 $\pm$ 61,01	94,07 $\pm$ 44,14	0,0002 $\pm$ 0,000447	72,79 $\pm$ 49,74
IL-2	0,0005 $\pm$ 0,000707	262,5 $\pm$ 371,2	0,0 $\pm$ 0,0	65,98 $\pm$ 132,0	0,0005 $\pm$ 0,000707	187,1 $\pm$ 264,6	0,0200 $\pm$ 0,04472	282,6 $\pm$ 286,1
IL-6	279,5 $\pm$ 13,56	389,9 $\pm$ 63,50	346,8 $\pm$ 122,3	504,3 $\pm$ 79,24	163,3 $\pm$ 230,9	539,3 $\pm$ 24,38	280,6 $\pm$ 196,9	437,2 $\pm$ 112,7
IL-10	41,68 $\pm$ 14,67	102,7 $\pm$ 34,57	0,0002 $\pm$ 0,0005	31,79 $\pm$ 63,59	0,0005 $\pm$ 0,000707	0,0005 $\pm$ 0,000707	0,0020 $\pm$ 0,004472	58,51 $\pm$ 130,8
INF- $\gamma$	0,0050 $\pm$ 0,007071	0,0005 $\pm$ 0,000707	60,62 $\pm$ 105,0	158,7 $\pm$ 274,9	0,0005 $\pm$ 0,000707	312,8 $\pm$ 403,5	112,2 $\pm$ 250,8	222,9 $\pm$ 366,1
TNF- $\alpha$	51,90 $\pm$ 41,27	112,2 $\pm$ 29,42	23,47 $\pm$ 31,06	207,5 $\pm$ 107,1	13,92 $\pm$ 4,271	44,56 $\pm$ 3,762	36,66 $\pm$ 36,22	93,10 $\pm$ 35,64
GM-CSF	50,20 $\pm$ 70,99	52,67 $\pm$ 74,48	76,27 $\pm$ 125,4	83,29 $\pm$ 108,4	63,79 $\pm$ 90,21	99,12 $\pm$ 140,2	0,0200 $\pm$ 0,04472	102,7 $\pm$ 99,46
IL-17	125,3 $\pm$ 93,28	179,0 $\pm$ 80,17	159,2 $\pm$ 31,91	196,2 $\pm$ 32,83	143,9 $\pm$ 30,41	208,8 $\pm$ 49,09	77,12 $\pm$ 61,93	171,5 $\pm$ 21,89

Citocinas	KO-INF- $\gamma$ GC meio	KO-INF- $\gamma$ GC C57	KO-INF- $\gamma$ GC57 meio	KO-INF- $\gamma$ GC57 C57	KO-IL-10 GC meio	KO-IL-10 GC C57	KO-IL-10 GC57 meio	KO-IL-10 GC57 C57
IL-1 $\alpha$	50,90 $\pm$ 71,98	129,0 $\pm$ 109,3	15,97 $\pm$ 35,72	101,5 $\pm$ 66,56	0,0500 $\pm$ 0,07071	19,71 $\pm$ 27,87	13,95 $\pm$ 31,18	82,16 $\pm$ 79,01
IL-2	154,1 $\pm$ 217,9	191,5 $\pm$ 270,8	50,34 $\pm$ 112,6	74,85 $\pm$ 167,4	1,000 $\pm$ 1,414	5,500 $\pm$ 7,778	2,000 $\pm$ 4,472	107,7 $\pm$ 148,1
IL-6	408,2 $\pm$ 12,60	535,0 $\pm$ 18,31	356,4 $\pm$ 207,1	5189 $\pm$ 7353	416,4 $\pm$ 234,7	1941 $\pm$ 1595	382,8 $\pm$ 132,6	2293 $\pm$ 1517
IL-10	12,50 $\pm$ 17,68	58,05 $\pm$ 82,09	10,41 $\pm$ 18,04	13,04 $\pm$ 14,81	NÃO AVALIADO	NÃO AVALIADO	NÃO AVALIADO	NÃO AVALIADO
INF- $\gamma$	NÃO AVALIADO	NÃO AVALIADO	NÃO AVALIADO	NÃO AVALIADO	0,0500 $\pm$ 0,07071	238,0 $\pm$ 336,6	0,0002 $\pm$ 0,000447	108,9 $\pm$ 151,3
TNF- $\alpha$	24,13 $\pm$ 1,994	135,7 $\pm$ 18,60	19,69 $\pm$ 19,04	365,3 $\pm$ 132,6	0,0500 $\pm$ 0,07071	175,8 $\pm$ 86,31	13,78 $\pm$ 14,06	148,6 $\pm$ 29,92
GM-CSF	0,0500 $\pm$ 0,07071	227,6 $\pm$ 20,08	0,0200 $\pm$ 0,04472	54,99 $\pm$ 75,62	0,0500 $\pm$ 0,07071	6,000 $\pm$ 8,485	0,0200 $\pm$ 0,04472	154,1 $\pm$ 48,62
IL-17	0,0500 $\pm$ 0,07071	131,1 $\pm$ 60,82	43,63 $\pm$ 69,33	103,3 $\pm$ 59,56	223,5 $\pm$ 114,9	235,6 $\pm$ 22,26	218,6 $\pm$ 63,29	245,1 $\pm$ 34,27

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

MIF – CD4	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	1227 $\pm$ 296,0	1964 $\pm$ 184,2	1376 $\pm$ 298,0	1262 $\pm$ 94,31
07 dias	1406 $\pm$ 229,8	1389 $\pm$ 362,3	1583 $\pm$ 43,29	1140 $\pm$ 36,27
14 dias	1307 $\pm$ 40,05	1359 $\pm$ 55,32	1086 $\pm$ 52,97	1358 $\pm$ 25,10

MIF – CD8	Selvagem	KO-ON	KO-INF- $\gamma$	KO-IL-10
Controle	2359 $\pm$ 223,0	2212 $\pm$ 569,8	2990 $\pm$ 345,7	1824 $\pm$ 543,4
07 dias	2687 $\pm$ 593,7	2923 $\pm$ 622,7	2700 $\pm$ 491,5	2668 $\pm$ 115,9
14 dias	2814 $\pm$ 144,3	3891 $\pm$ 365,6	2738 $\pm$ 578,2	1369 $\pm$ 82,57

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

TNF- $\alpha$	Selvagem	KO ON	KO INF	KO IL-10
Controle	226,2 $\pm$ 52,30	284,3 $\pm$ 72,55	254,6 $\pm$ 24,05	297,4 $\pm$ 40,02
07 dias	270,6 $\pm$ 52,72	258,2 $\pm$ 34,69	240,4 $\pm$ 24,78	375,2 $\pm$ 67,23
14 dias	256,2 $\pm$ 18,48	305,4 $\pm$ 48,27	268,3 $\pm$ 68,41	304,2 $\pm$ 48,83

IL-1 $\alpha$	Selvagem	KO ON	KO INF	KO IL-10
Controle	647,9 $\pm$ 13,43	643,4 $\pm$ 37,62	623,7 $\pm$ 19,40	679,1 $\pm$ 16,97
07 dias	631,5 $\pm$ 24,95	642,5 $\pm$ 12,92	579,9 $\pm$ 12,63	696,0 $\pm$ 40,97
14 dias	658,7 $\pm$ 36,35	692,0 $\pm$ 84,59	641,1 $\pm$ 30,84	693,3 $\pm$ 20,60

IL-6	Selvagem	KO ON	KO INF	KO IL-10
Controle	310,2 $\pm$ 43,02	306,2 $\pm$ 79,69	337,7 $\pm$ 81,45	340,4 $\pm$ 91,96
07 dias	359,5 $\pm$ 100,4	320,2 $\pm$ 70,53	272,3 $\pm$ 52,13	422,0 $\pm$ 76,46
14 dias	334,7 $\pm$ 68,91	371,0 $\pm$ 91,04	344,8 $\pm$ 41,37	377,8 $\pm$ 77,94

INF- $\gamma$	Selvagem	KO ON	KO INF	KO IL-10
Controle	376,9 $\pm$ 41,28	403,3 $\pm$ 32,70	Não avaliado	459,1 $\pm$ 31,16
07 dias	424,4 $\pm$ 40,95	394,6 $\pm$ 15,81	Não avaliado	476,1 $\pm$ 69,55
14 dias	389,9 $\pm$ 35,26	440,7 $\pm$ 51,26	Não avaliado	490,7 $\pm$ 62,14

<b>IL-17</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	206,4 ± 57,84	213,0 ± 26,80	257,4 ± 68,32	254,1 ± 58,39
07 dias	254,3 ± 40,08	224,3 ± 36,46	200,8 ± 39,22	290,7 ± 91,91
14 dias	219,6 ± 30,11	227,9 ± 52,88	259,0 ± 38,48	254,1 ± 84,64

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

<b>IL-10</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	302,8 ± 136,0	346,1 ± 150,2	365,8 ± 191,1	Não avaliado
07 dias	385,4 ± 122,1	294,1 ± 80,50	247,4 ± 48,54	Não avaliado
14 dias	328,3 ± 53,18	298,1 ± 173,2	336,0 ± 141,1	Não avaliado

<b>IL-13</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	636,6 ± 165,9	638,9 ± 138,8	554,6 ± 133,4	581,0 ± 150,9
07 dias	572,7 ± 179,5	503,1 ± 117,6	462,3 ± 36,10	687,1 ± 198,7
14 dias	583,7 ± 93,94	623,8 ± 240,5	527,1 ± 79,97	565,4 ± 140,7

<b>IL-5</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	359,4 ± 67,31	384,1 ± 75,46	381,7 ± 72,54	479,4 ± 57,28
07 dias	432,5 ± 90,35	396,4 ± 66,05	368,5 ± 33,00	531,5 ± 169,4
14 dias	396,7 ± 95,01	417,9 ± 103,4	456,3 ± 80,01	480,4 ± 94,85

<b>IL-4</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	296,4 ± 52,59	297,4 ± 52,26	271,4 ± 63,09	350,3 ± 71,25
07 dias	319,5 ± 112,2	248,1 ± 81,21	285,0 ± 20,69	367,6 ± 93,87
14 dias	271,2 ± 74,39	329,4 ± 50,79	318,4 ± 58,19	313,0 ± 73,37

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *C57Black/6* selvagem, *C57Black/6-KO-ON*, *C57Black/6-KO-INF- $\gamma$*  e *C57Black/6-KO-IL-10*:

<b>IL-2</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	549,1 ± 86,42	580,4 ± 67,32	613,7 ± 43,10	613,9 ± 90,67
07 dias	618,3 ± 73,59	573,3 ± 52,71	542,2 ± 26,12	654,5 ± 114,6
14 dias	596,3 ± 30,54	646,5 ± 170,7	591,3 ± 43,12	579,0 ± 97,02

<b>IL-21</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	348,3 ± 136,0	428,6 ± 219,5	457,6 ± 272,5	470,3 ± 371,5
07 dias	458,5 ± 365,8	326,5 ± 205,8	217,2 ± 101,1	647,1 ± 396,1
14 dias	407,1 ± 72,79	391,4 ± 126,3	501,2 ± 240,2	464,8 ± 222,3

<b>IL-22</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	48,06 ± 6,265	48,42 ± 4,132	53,95 ± 8,809	54,93 ± 14,02
07 dias	59,10 ± 16,55	51,93 ± 12,14	47,38 ± 3,629	65,61 ± 17,51
14 dias	52,25 ± 8,409	59,04 ± 22,95	56,45 ± 9,143	55,43 ± 15,33

<b>IL-27</b>	<b>Selvagem</b>	<b>KO ON</b>	<b>KO INF</b>	<b>KO IL-10</b>
Controle	1194 ± 175,7	1322 ± 71,97	1268 ± 200,0	1458 ± 137,2
07 dias	1342 ± 146,3	1319 ± 129,9	1241 ± 58,55	1521 ± 226,3
14 dias	1210 ± 113,7	1340 ± 198,8	1294 ± 153,3	1441 ± 182,1

## APÊNDICE C

---

Neste apêndice estão agrupadas todas as médias aritméticas com os respectivos desvios padrões ( $X \pm SD$ ) dos experimentos relacionados ao terceiro manuscrito.

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação do peso do Baço de camundongos *Balb/c*:

Avaliação	Balb/c controle	Balb/c infec. T1	Balb/c infec. C57
Peso Baço	0,2884 ± 0,02971	0,3846 ± 0,05494	1,170 ± 1,236

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da quantidade leucocitária total e diferencial nos camundongos *Balb/c*:

Avaliação	Balb/c controle	Balb/c infec. T1	Balb/c infec. C57
Células Totais	1,286 ± 0,5856	4,282 ± 2,564	18,14 ± 28,61
Macrófagos	0,2395 ± 0,1151	1,584 ± 1,075	5,788 ± 8,781
Linfócitos	1,028 ± 0,4651	3,783 ± 2,735	11,46 ± 19,57
Neutrófilos	0,01814 ± 0,01084	0,3085 ± 0,1628	0,3786 ± 0,5659

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da média de intensidade de fluorescência (MIF) de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos camundongos *Balb/c*:

Avaliação	Balb/c controle	Balb/c infec. T1	Balb/c infec. C57
MIF-CD4	516,9 ± 348,4	781,0 ± 501,0	1501 ± 983,8
MIF-CD8	1129 ± 743,6	1850 ± 753,7	2241 ± 1015

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-17 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*:

Avaliação	Balb/c controle	Balb/c infec. T1	Balb/c infec. C57
IL-1 $\alpha$	218,1 $\pm$ 92,40	340,5 $\pm$ 76,83	186,8 $\pm$ 73,25
IL-6	17,58 $\pm$ 39,32	124,3 $\pm$ 54,07	37,04 $\pm$ 61,98
INF- $\gamma$	181,5 $\pm$ 56,67	350,2 $\pm$ 242,8	278,3 $\pm$ 135,5

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-10, IL-13, IL-5 e IL-4 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*:

Avaliação	Balb/c controle	Balb/c infec. T1	Balb/c infec. C57
IL-10	273,7 $\pm$ 612,0	457,4 $\pm$ 476,0	0,0200 $\pm$ 0,04472
IL-13	74,54 $\pm$ 166,7	598,8 $\pm$ 241,7	421,8 $\pm$ 258,8
IL-5	11,98 $\pm$ 26,78	38,22 $\pm$ 58,08	29,92 $\pm$ 64,83
IL-4	0,0200 $\pm$ 0,04472	0,0200 $\pm$ 0,04472	3,478 $\pm$ 7,777

Médias aritméticas com os desvios padrões ( $X \pm SD$ ) da determinação da produção das citocinas IL-2, IL-21, IL-22 e IL-27 no homogenato do baço dos camundongos *Balb/c*:

Avaliação	Balb/c controle	Balb/c infec. T1	Balb/c infec. C57
IL-2	223,2 $\pm$ 198,2	375,8 $\pm$ 164,8	294,0 $\pm$ 181,6
IL-21	420,1 $\pm$ 655,1	866,1 $\pm$ 977,4	66,18 $\pm$ 148,0
IL-22	23,97 $\pm$ 53,59	26,18 $\pm$ 58,54	14,55 $\pm$ 25,09
IL-27	11,37 $\pm$ 25,43	6,750 $\pm$ 15,09	82,98 $\pm$ 88,00

**ANEXOS**

Molecular and serological identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Mycobacterium* spp. in goats with abscesses in superficial lymph nodes.

I. Fehlberg<sup>a</sup>; A. Cde Alcântara<sup>a</sup>; R.E. Fraga<sup>a</sup>; R. C. Bahia<sup>a</sup>; L. F. Moura-Costa<sup>a</sup>; C. D. Marassi<sup>b</sup>; W. Lilenbaum<sup>b</sup>; R.J. M. Nascimento<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biointeração, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular. Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N – Vale do Canela CEP: 40.110-100 Salvador, Bahia, Brazil; <sup>b</sup>Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Rua Professor Hernani Mello, 101 - Centro CEP: 24210-030 - Niteroi, RJ - Brazil.

\* Author address and to which proofs should be sent:

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

Phone.: 55-71- 3235-9682

Fax: 55-71-3235-9682

e-mail address: rmeyer@ufba.br; Meyer.roberto@gmail.com (R. Meyer)

## Abstract

The semi-arid region of Bahia state (Brazil) is endemic for Caseous lymphadenitis (CLA) and bovine tuberculosis, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Mycobacterium bovis*, respectively. Bovines and goats are commonly raised together, enabling transmission of *M. bovis* to goats. This study evaluated 1,639 goats and 56 presenting superficial abscesses were further investigated for both pathogens. *Corynebacterium pseudotuberculosis* was identified by culture and mPCR in 40 (71.4%) and 41 (73.2%) of the abscesses, respectively, while *Mycobacterium* spp. were not identified in any of the lesions by mPCR. Based on the ELISA results, 73.2% (41) of the goats reacted positively to CLA, while 12.5% (7) tested positive for tuberculosis. The success of the molecular detection attained for *C. pseudotuberculosis* indicates that the DNA extraction method used followed by the mPCR could replace the culture in the detection of CLA in goats with external lesions. Although 12.5% of goats sera reacted for tuberculosis, additional studies are needed to exclude cross reaction among these pathogens.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium* spp., ELISA, mPCR



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



#### CERTIFICADO

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

#### CERTIFICATE

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

Salvador, 12 de agosto de 2010

Profª Dra. Songeli Menezes Freire  
 Presidente da CEUA-ICS

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>