

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

ÉLIDA APARECIDA LEAL

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR EM ANIMAIS
IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS DE *YERSINIA PESTIS***

**Belo Horizonte - MG
2015**

ÉLIDA APARECIDA LEAL

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR EM ANIMAIS
IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS DE *YERSINIA PESTIS***

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador(a) Prof(a). Dr(a). Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães - UFMG

Co-orientador Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo - UFMG

**Belo Horizonte - MG
2015**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR EM ANIMAIS
IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS DE YERSINIA PESTIS**

ÉLIDA APARECIDA LEAL

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas, área de concentração Análises Clínicas e Toxicológicas.

Aprovada em 17 de setembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães - Orientadora
Faculdade de Farmácia – UFMG

Prof. Vicente de Paulo C. P. de Toledo – Coorientador
UFMG

Dr. Cláudio José Augusto
FUNED

Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida
FIOCRUZ-PE

Belo Horizonte, 17 de setembro de 2015.

Aos meus queridos pais, Maria e Geraldo, meus grandes incentivadores e meus melhores exemplos de vida. Registro aqui toda minha gratidão por todos os investimentos feitos na minha educação. Valeu muito à pena! É com muito prazer e alegria que compartilho com vocês a realização de mais este sonho, mais esta vitória!

À minha amada filha Isabella, que mesmo com tão pouca idade entendeu de maneira madura as minhas ausências que se fizeram necessárias para a concretização deste trabalho. Você é minha grande fonte de alegria e razão dos meus incansáveis esforços e dedicação!

Ao meu querido namorado Max que, com paciência e sabedoria, me apoiou em todas as etapas deste projeto profissional. Você é minha grande inspiração. Esta conquista é nossa!

Ao meu irmão Thales, pela amizade, companheirismo e conselhos científicos. Pelo exemplo de pessoa e profissional. A você, minha admiração sempre!

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu maior companheiro, a quem tantas vezes recorri nos momentos de dificuldade e cansaço. O Senhor, mais uma vez, atendeu às minhas preces. Foi confiando plenamente nas tuas palavras que venci mais esta etapa.

“Entrega teu caminho ao Senhor, confia nele e ele o fará.” Salmo 37:5.

À minha orientadora Prof. Dra. Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães, por ter me recebido carinhosamente em seu laboratório. Muito obrigada pelo aprendizado, pela confiança e paciência. Você é meu exemplo de ética, profissionalismo e humildade!

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais”. Rubem Alves

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo, agradeço imensamente pelo apoio intelectual e técnico, sobretudo pelas enriquecedoras sugestões e pelo auxílio nas etapas de imunização dos camundongos e de preparo de reagentes e meios de cultura que foram fundamentais para o sucesso dos experimentos.

À Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida, pelo fornecimento dos insumos necessários para a realização dos experimentos e, principalmente, por ter despertado em mim o interesse em aprofundar meus estudos acerca da Peste.

À Fundação Ezequiel Dias que, através do Programa de Capacitação em Recursos Humanos, me concedeu afastamento parcial das minhas atividades laboratoriais que foi essencial para que eu pudesse me dedicar mais intensamente a este trabalho.

À Dra. Marluce Aparecida Assunção Oliveira, Diretora do Instituto Octávio Magalhães/FUNED, pelo constante apoio e incentivo, que foram imprescindíveis para o meu crescimento profissional. A você, toda minha gratidão!

Ao Dr. Cláudio José Augusto, pela valiosa ajuda no manuseio das cepas de *Yersinia pestis*.

À Dra. Carmem Dolores Faria, chefe do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas (FUNED), por compreender às minhas ausências.

Aos meus queridos avós, Tito e Conceição, por sempre se lembrarem de mim em suas orações.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da UFMG, Janaína, Larissa, Pedro e Josimar, pelos bons momentos compartilhados, pela disponibilidade e colaboração na execução dos experimentos.

Às queridas Fernanda e Marcela, pela valiosa ajuda nas etapas de padronização dos experimentos de citometria de fluxo. Sem vocês seria tudo mais difícil!

Às amigas da pós-graduação, Marcela, Michele, Tatiana, Tamara e Simone, por terem compartilhado não só as aflições do mundo acadêmico, mas as pequenas alegrias do dia-a-dia. Só tenho a agradecer pelos 2 anos de convivência, espero que este seja só o começo de uma longa amizade!!

Às amigas de longas datas, Géssica, Josi, Michelle e Nathalie, que mesmo longe dão provas de carinho, amizade e companheirismo. Obrigada pela torcida!!

Às amigas do dia-a-dia, Simone e Terezinha, pelo incentivo e por me alegrarem nos momentos de ansiedade e sobrecarga.

A todos os colegas do Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas (FUNED), que supriram as minhas inumeráveis ausências no laboratório.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

RESUMO

A peste representa ainda hoje uma ameaça real em diversos continentes, sendo recentemente definida pela Organização Mundial da Saúde como uma doença reemergente. A ocorrência de surtos de peste humana em vários países e a possibilidade de utilização ilegítima da *Yersinia pestis* como arma biológica reforça a necessidade de se estudar a imunidade induzida pelos potenciais candidatos à vacina, tendo em vista a utilização futura desses antígenos na imunoprofilaxia da peste. Com este intuito, investigou-se a imunogenicidade de preparações antigênicas baseadas na proteína F1 e no extrato total de *Y. pestis* a fim de verificar a participação destes antígenos na indução da produção de anticorpos, na determinação do fenótipo de linfócitos T esplênicos e no estímulo à produção das citocinas IFN- γ e IL-10 pelas subpopulações de células T CD4 e CD8. Para isso, utilizou-se camundongos fêmeas Swiss Webster que foram imunizadas, por via intramuscular, com 40 μ g ou 20 μ g da proteína F1 purificada e do extrato total de *Y. pestis* administrados em duas doses com intervalo de 21 dias e uma dose reforço de 4 μ g e 2 μ g que foi administrada, por via intravenosa, no 42º dia após a imunização primária. No 45º dia, realizou-se a eutanásia dos animais bem como a coleta do sangue e a retirada do baço. Os títulos de anticorpos anti-F1 induzidos pelos diferentes esquemas de imunização foram avaliados no soro através do teste de hemaglutinação indireta. A análise fenotípica das subpopulações de linfócitos T esplênicos e a detecção intracelular das citocinas IFN- γ e IL-10 foram feitas por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais. Os animais imunizados com o extrato total de *Y. pestis* nas doses de 40 μ g e 20 μ g não apresentaram anticorpos anti-F1, da mesma forma que os animais do grupo controle. Por outro lado, os animais imunizados com o antígeno F1 purificado, tanto na dose de 40 μ g quanto na dose de 20 μ g, apresentaram resultados positivos com títulos variando de 1/16 a 1/8132. Com relação à análise fenotípica, foi observado que a média de células T CD3⁺-CD4⁺ e TCD3⁺-CD8⁺ não difere significativamente entre os diferentes grupos estudados. Quanto à detecção de citocinas foi verificado que o extrato total e o antígeno F1 de *Y. pestis* não induzem a expressão significativa de IFN- γ e IL-10 em linfócitos T-CD4⁺. A proteína F1 também não induz a expressão de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺, ao contrário do extrato total de *Y. pestis*. Os resultados apontaram que a proteína F1, embora seja um importante indutor de resposta imune

humoral, não é um antígeno imunogênico para célula T e ainda que o extrato total de *Y. pestis* na dose de 40 µg parece favorecer a imunidade celular mediada pelo linfócito T CD8.

Palavras-chave: *Yersinia pestis*, anticorpos, citocinas IFN- γ e IL-10, vacinas.

ABSTRACT

The plague still poses a real threat in several continents and it has recently been defined by the World Health Organization as a re-emerging disease. The occurrence of human plague outbreaks in several countries and the possibility of illegitimate use of *Yersinia pestis* as a biological weapon reinforce the need to study the immunity induced by potential vaccine candidates having in mind the future use of these antigens in immunoprophylaxis of the plague. With this purpose, the immunogenicity of the antigenic preparations based on F1 protein and on the total extract from *Y. pestis* was investigated in order to verify the role of these antigens in inducing the production of antibodies, as well as in determining the phenotype of splenic T-lymphocytes and also the stimulation of the production of IFN- γ and IL-10 through the subpopulations of T CD4 and CD8 cells. In order to achieve this objective, female Swiss Webster mice were intramuscularly immunized with 40 μ g or 20 μ g of the purified F1 and total protein extract from *Y. pestis*, given in two doses with a 21 day interval and one booster dose of 4 μ g or 2 μ g that was administered intravenously on the 42nd day after the primary immunization. On the 45th day, euthanasia of the animals was performed as well as the collection of blood and removal of the spleen. The titers of anti-F1 antibodies induced by different immunization schedules were evaluated in serum through the indirect hemagglutination test. Phenotypic analysis of subpopulations of splenic T cells and the detection of intracellular IFN- γ and IL-10 were performed by flow cytometry using monoclonal antibodies. Animals immunized with total extract from *Y. pestis* at doses of 40 μ g and 20 μ g didn't show anti-F1 antibody in the test, in the same way as the control animals. On the other hand, animals immunized with the purified F1 antigen, both at a dose of 40 μ g as well as at a 20 μ g dose showed positive results with titers ranging from 1/16 to 1/8132. With respect to the phenotypic analysis, it was observed that the average of T CD3⁺-CD4⁺ cells and T CD3⁺-CD8⁺ do not significantly differ between the studied groups. As for the detection of cytokines, it was found that the total extract and the F1 antigen of *Y. pestis* do not induce significant expression of IFN- γ and IL-10 in CD4 T-lymphocytes. The F1 protein also does not induce IFN- γ expression on CD8⁺ T cells, unlike the total extract from *Y. pestis*. Overall, the results showed that the F1 protein, although an important inducer of humoral immune

response, is not immunogenic T cell antigen even if the total extract from *Y. pestis* at dose of 40 µg seems to favor cellular immunity mediated by T lymphocytes CD8.

Keywords: *Yersinia pestis*, antibodies, IFN- γ and IL-10 cytokines, vaccines.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Determinação do perfil *in vivo* de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) de camundongos fêmeas Swiss Webster (n = 4 animais) após imunização com extrato total e antígeno F1, de *Y. pestis*. 45
- Figura 2** - Determinação do perfil *in vivo* de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) em camundongos fêmeas Swiss Webster (n = 4 animais) após imunização com extrato total e antígeno F1, de *Y. pestis*. 46
- Figura 3** - Produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com extrato total de *Y. pestis*. 47
- Figura 4** - Produção da citocina IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com extrato total de *Y. pestis*. 48
- Figura 5** - Produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com antígeno F1 de *Y. pestis*. 49
- Figura 6** - Produção da citocina IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com antígeno F1 de *Y. pestis*. 49
- Figura 7** - Produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com extrato total de *Y. pestis*. 50
- Figura 8** - Produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com antígeno F1 de *Y. pestis*. 50
- Figura 9** - Esquema representativo dos parâmetros avaliados no presente trabalho e os respectivos resultados obtidos. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos e esquema de imunização.....	37
Tabela 2 - Títulos de anticorpos anti-F1 obtidos na hemaglutinação indireta.....	44
Tabela 3 - Porcentagem das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺, por grupo, no 45º dia após a imunização com extrato total e o antígeno F1 purificado, de <i>Y. pestis</i> (n = 4 animais).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
APC	Aloficocianina
BAB	“Blood Agar Base” (Agar base de sangue)
BHI	“Brain Heart Infusion Broth”
BSA	Soro albumina bovina
°C	Graus centígrados
CD	“Cluster of Differentiation” (Grupo de diferenciação)
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
d.C.	“Depois de Cristo”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Ensaio Imunoenzimático)
F1	Fração 1
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
g	Força gravitacional
g	grama
h	hora
Hms	“Hemin storage” (Armazenamento de hemina)
HPI	Ilha de Alta Patogenicidade
IFN	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IS	“Insertion sequences” (Sequências de inserção)
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
Lcr	“Low calcium response”
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	“Major histocompatibility complex” (Complexo de histocompatibilidade principal)
min.	minuto
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	micrômetro
mL	Mililitro
mm	milímetro
MS	Ministério da Saúde
NK	“Natural Killer”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCP	Programa de Controle de Peste
PE	Ficoeritrina
PeCy7	Ficoeritrina cianina 7
PerCP CY5.5	Clorofil de Peridina Cianina 5.5

pgm	“Pigmentation” (Pigmentação)
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
SDBF	Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas
SRP	Serviço de Referência em Peste
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TCR	Receptor de célula T
Th	Linfócito T helper
TLR	“Toll Like receptor” (Receptores do tipo Toll)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
T3SS	Sistema de secreção do tipo três
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Yop	Proteína de membrana externa de <i>Yersinia</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	19
2.1 A peste e sua importância histórica	19
2.2 Epidemiologia da peste em Minas Gerais	21
2.3 <i>Yersinia pestis</i> : Evolução e características genéticas	22
2.3.1 <u>O cromossomo</u>	23
2.3.2 <u>Plasmídeos de virulência</u>	24
2.4 A resposta imune contra a <i>Yersinia pestis</i>	25
2.4.1 <u>Resposta imune inata</u>	25
2.4.2 <u>Resposta imune adaptativa</u>	26
2.5 Os fatores de virulência de <i>Yersinia pestis</i> e seus efeitos no hospedeiro	28
2.5.1 <u>Sistema de secreção do tipo III</u>	28
2.5.2 <u>Lipopolissacarídeo</u>	28
2.5.3 <u>Cápsula F1</u>	29
2.6 Vacinas contra a peste	29
2.7 Diagnóstico da peste	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 MATERIAL E METODOS	34
4.1 Delineamento do estudo	34
4.2 Animais de Experimentação	34
4.2.1 <u>Considerações Éticas</u>	34
4.2.2 <u>Seleção da linhagem</u>	35
4.2.3 <u>A eutanásia</u>	35
4.2.4 <u>Tamanho da amostra</u>	34
4.3 Cepa e antígeno F1 de <i>Y. pestis</i>	36
4.4 Preparo do extrato total e antígeno F1 de <i>Y. pestis</i>	36
4.5 Imunização dos animais	37
4.6 Avaliação da resposta imune humoral	38
4.6.1 <u>Hemaglutinação indireta</u>	38

4.7 Avaliação da resposta imune celular.....	38
4.7.1 Obtenção das células mononucleares esplênicas.....	39
4.7.2 <u>Viabilidade das células esplênicas</u>.....	39
4.7.3 <u>Caracterização imunofenotípica dos linfócitos esplênicos</u>.....	39
4.7.4 <u>Detecção intracelular das citocinas IL-10 e IFN-γ produzidas por células esplênicas estimuladas com antígenos de <i>Y.pestis</i></u>.....	41
4.8 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Avaliação da resposta imune humoral.....	43
5.2 Análise fenotípica dos linfócitos T esplênicos.....	44
5.3 Detecção intracitoplasmática das citocinas IL-10 e IFN-γ.....	46
6 DISCUSSÃO	52
6.1 Perspectivas futuras.....	57
7 CONCLUSÕES.....	58
REFERENCIAS	59
ANEXO A.....	69

1 INTRODUÇÃO

A peste é uma doença infecciosa bacteriana de alto potencial epidêmico com grande importância na história da humanidade. Embora desconhecida pela sociedade, governos e pela maioria dos profissionais de saúde, a peste continua sendo uma ameaça real nos dias atuais e um problema de saúde pública em diversos países da África, Ásia e Américas, sendo definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença reemergente.

Em 2013, foram reportados à OMS 783 casos de peste humana com um total de 126 óbitos (OMS, 2014). Embora a maioria dos casos notificados seja da forma bubônica, adquirida através da picada de pulgas infectadas pela *Yersinia pestis*, os surtos com ocorrências de peste pneumônica também têm sido reportados: o mais recente ocorreu em setembro de 2015 em Madagascar (África) no qual foi registrado o envolvimento de 15 pessoas e 11 mortes (OMS, 2015). Na América do Sul, o último episódio aconteceu no Peru em 2010, com 21 casos notificados, sendo 4 na forma pneumônica (PERU, 2013). A peste pneumônica representa uma grande preocupação devido a sua alta contagiosidade e o risco significativo de propagação através do turismo internacional, o que a torna importante do ponto de vista epidemiológico. O isolamento de cepa de *Y. pestis* resistente a múltiplos fármacos (GALIMAND *et al.*, 1997) e o potencial uso do microrganismo como agente de bioterrorismo já foram relatados na literatura e também constituem uma grave ameaça à saúde humana (PARKHILL *et al.*, 2001).

Diante da ocorrência de surtos de peste humana em diversos continentes e da possibilidade de utilização ilegítima da *Y. pestis* como arma biológica torna-se importante o estudo da imunidade induzida pelos potenciais candidatos à vacina vislumbrando a utilização futura desses antígenos na imunoprofilaxia da peste.

As preparações antigênicas baseadas em subunidades da bactéria são as grandes promessas para uso como vacina no futuro. A proteína capsular F1 (fração 1) de *Y. pestis*, por exemplo, já tem sido avaliada em diversos estudos de imunização com animais experimentais. Por outro lado, as vacinas formuladas com a bactéria inteira morta, por serem constituídas por uma mistura de antígenos, podem também contribuir para uma indução eficaz da resposta imune. Porém não foi completamente esclarecido o mecanismo de proteção conferido por essas preparações. É neste

contexto que faz-se necessário investigar o potencial imunogênico de preparações baseadas no F1 e no extrato total de *Y. pestis* a fim de verificar a participação destes antígenos na geração de respostas imunes humorais, reconhecidamente importantes na eliminação da *Y. pestis* durante seu ciclo de vida extracelular e na indução de respostas de células T, imprescindíveis para eliminação dos bacilos intracelulares e para geração de memória imunológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A peste e sua importância histórica

A peste, doença infecciosa de grande magnitude e transcendência na história da humanidade, é uma zoonose essencialmente de roedores causada pela *Y. pestis*, cuja transmissão ocorre geralmente através da picada de pulgas infectadas com a bactéria. Além dos roedores, diversas espécies de animais (cães, coelhos, camelos entre outros) são susceptíveis à infecção e participam do ciclo epidemiológico na natureza. O homem é um hospedeiro acidental e infecta-se quando penetra no ecossistema dos roedores em atividades de caça, agricultura, comércio ou lazer (BRASIL, 2008; PERRY & FETHERSON, 1997).

A história científica da peste começou em Hong Kong, no ano de 1894, quando Alexander Yersin isolou a bactéria causadora da infecção e identificou-a microscopicamente. Em seus estudos com cadáveres humanos, Yersin examinou também gânglios linfáticos de ratos mortos encontrados pelas ruas chinesas, descobrindo também a importante ligação causal dos roedores com a epidemia que dizimava as populações humanas daquela época. Outro marco relevante na história da peste foi o reconhecimento do papel da pulga na transmissão da doença, que aconteceu em 1898 por Paul-Louis Simond (SIMOND, 1898).

Conceitos antigos sugerem que a peste teria surgido como doença entre os primeiros mamíferos placentários no Planalto Central Asiático (POLLITZER, 1954). Durante a era Cristã, diversas doenças foram classificadas indevidamente como peste, no entanto os registros atuais apontam três grandes pandemias que foram bem estudadas e caracterizadas.

A primeira pandemia é conhecida como “Peste Justiniano” e aconteceu entre os anos 542-605 d.C. Teve origem no Egito e se espalhou ao redor do Mar Mediterrâneo, atingindo Ásia, África e Europa. Estima-se que durante este período foram mortas cerca de 100 milhões de pessoas. A segunda pandemia, a temível “Peste Negra”, foi registrada entre os séculos XIV e XVIII teve início na Ásia e posteriormente estendeu-se por toda a Europa e Norte da África dizimando um quarto da população européia entre os anos de 1347 e 1353. A terceira pandemia, ou Pandemia Contemporânea, originou-se na Mongólia estendendo-se para Hong Kong em 1894, por onde

rapidamente espalhou-se através do transporte marítimo (PERRY & FETHERSTON, 1997; POLLITZER, 1954).

A expansão da terceira pandemia declinou com a Segunda Guerra Mundial com a substituição dos navios antigos pelos novos a prova de ratos, no entanto foi a partir deste período que a peste atingiu as Américas, África do Sul, Madagascar e Indochina, onde grandes surtos humanos ocorreram nas cidades portuárias (MOLLARET, 1989). Posteriormente, a infecção foi gradualmente propagada para o interior seguindo as rotas de transporte. Nas áreas rurais, a peste foi transmitida aos roedores silvestres que constituem hoje o principal reservatório da infecção nos focos que se estabeleceram em vários países da África, Ásia e América (SCHNEIDER *et al.*, 2014). A chegada da peste ao Brasil aconteceu pelo porto de Santos no estado de São Paulo, em 1899, onde foi registrado o primeiro caso humano. Várias cidades portuárias foram atingidas e em seguida a doença expandiu para o interior através das rotas terrestres (OMS, 1965). Atualmente a peste mantém-se entre a população de roedores silvestres nos focos naturais dos estados do Nordeste, Minas Gerais e Rio de Janeiro (BRASIL, 2008). A persistência da infecção entre os roedores silvestres e a sua provável transmissão para animais domésticos e para os humanos torna a peste um problema de saúde pública merecedor de atenção (ALMEIDA *et al.*, 2007).

A OMS recomenda a vigilância permanente nos focos espalhados pelos diversos continentes (GAGE, 1999). No Brasil, o monitoramento da circulação da *Y. pestis* e a proteção das populações humanas são atribuições do Programa de Controle da Peste (PCP) do Ministério da Saúde (MS), que desenvolve rotineiramente suas atividades (ARAGÃO *et al.*, 2009). As medidas de vigilância têm como objetivo detectar precocemente indicadores de atividade pestosa entre os animais a tempo de desencadear as medidas preventivas que evitem o comprometimento humano (BRASIL, 2008).

A recomendação atual do ministério da saúde (MS) estabelece que o monitoramento epidemiológico da peste no Brasil deve ser feito mediante coleta regular de amostras de sangue de cães para a realização de exames sorológicos para detecção de anticorpos específicos contra a peste (MS, 2007). Alguns exames têm se mostrado positivos, indicando a presença de anticorpos antipestosos nestes animais e sugerindo que os focos brasileiros permanecem ativos (ARAGÃO *et al.*, 2009; FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS, 2014).

Atualmente, a ocorrência de peste humana no Brasil é um evento raro e o último caso confirmado ocorreu no estado do Ceará (município de Pedra Branca) no ano de 2005 (ALMEIDA *et al.*, 1988; ARAGÃO *et al.*, 2009; BRASIL, 2008). No homem, a infecção manifesta-se sob três formas clínicas principais: bubônica, septicêmica e pneumônica. A forma bubônica é a manifestação clínica mais comum da infecção, caracterizada por febre alta, dores generalizadas, pulso rápido e irregular, taquicardia, hipotensão arterial e pela presença de linfadenite regional (inflamação aguda dos linfonodos - bubões pestosos) que desenvolve-se no 2º a 3º dia de doença como consequência da picada da pulga infectada. Se não tratada, pode evoluir para forma septicêmica, caracterizada pela presença constante do bacilo no sangue, sem reações ganglionares visíveis. A peste pneumônica, pode se desenvolver como resultado da peste bubônica ou septicêmica e consiste na forma mais perigosa da doença pelo quadro clínico grave e pela alta contagiosidade. Nesta fase o contágio ocorre diretamente de pessoa a pessoa através da inalação de aerossóis contendo bactérias, o que representa uma grave ameaça à saúde pública (BRASIL, 2008).

2.2 Epidemiologia da peste em Minas Gerais

Na década de 1970 foi criada uma rede pública de laboratórios que foram estrategicamente distribuídos nos estados do Nordeste, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Participam desta rede laboratórios de apoio, cuja atribuição é coletar, preparar e encaminhar as amostras para os laboratórios centrais de saúde pública (LACEN) que são responsáveis pela realização dos exames sorológicos para diagnóstico e monitoramento da peste no Brasil (BRASIL, 2008). Essas atividades são coordenadas à nível nacional pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) que trabalha integradamente com o Serviço de Referência Nacional em Peste (SRP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz - Pernambuco.

Em Minas Gerais, as ações de vigilância da peste são coordenadas pela Diretoria de Vigilância Ambiental/Zoonoses do Programa de Controle de Peste em conjunto com o Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN-MG/FUNED), que realiza os exames sorológicos das amostras provenientes dos dois focos naturais do estado: Vale do Jequitinhonha e Vale do Rio Doce.

No período de 2007 a 2014 foram obtidos em Minas Gerais 29 resultados de sorologia positiva em cães (FUNED, 2014). Apesar da baixa positividade verificada e da ausência de casos humanos, a persistência da positividade indica situação epidemiológica relevante no estado e reforça a necessidade de monitoramento contínuo dos focos por meio de atividades de vigilância ambiental visando impedir a transmissão da doença para humanos (BRASIL, 2008).

2.3 *Yersinia pestis*: Evolução e características genéticas

A *Y. pestis*, agente causador da peste, pertence a família Enterobacteriaceae. O gênero *Yersinia* compreende atualmente 17 espécies de bactérias, algumas patogênicas para o homem, outras ambientais ou oportunistas, são elas: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*, *Y. mollareti*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. rodheii*, *Y. ruckeri*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. nurmii* e *Y. pekkaneni* (MERHEJ *et al.*, 2008; MURROS-KONTIAINEN *et al.*, 2011a; MURROS-KONTIAINEN *et al.*, 2011b; SPRAGUE, *et al.*, 2005; SPRAGUE, *et al.*, 2008; SULAKVELIDZE, 2000).

A *Y. pestis*, é um bactéria gram-negativa, imóvel, não-formadora de esporos, que apresenta-se, na microscopia óptica como um bacilo curto, ovóide e de coloração bipolar (extremidades escuras). É um microrganismo aeróbico ou anaeróbico facultativo que cresce bem em meios usuais a 28°C e pH entre 7,2 a 7,6 (PERRY & FETHERSON).

Estudos revelam que o cromossomo de *Y. pestis* apresenta alta homologia com o de *Y. pseudotuberculosis*, sugerindo que a *Y. pestis* seja um clone que evoluiu a partir da *Y. pseudotuberculosis*. Neste processo evolutivo, a *Y. pseudotuberculosis* sofreu alterações genéticas, entre elas a inativação de genes e a aquisição de plasmídeos, que a tornaram capaz de codificar vários fatores de virulência decisivos para as modificações na patogenicidade e no ciclo de vida do patógeno, para adaptação a novos hospedeiros e para mudança na rota de transmissão, que agora é dependente de um vetor, a pulga (ACHTMAN *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2014).

O genoma de *Y. pestis* é extraordinariamente rico em elementos genéticos móveis, sobretudo as seqüências de inserção (IS), que estão associadas aos eventos de recombinação gênica sofridos pelo DNA do microrganismo ao longo dos anos

(RADNEDGE *et al.*, 2002). Estes eventos foram decisivos para o surgimento de cepas de *Y. pestis* com perfil genético diferente (CO₉₂, KIM e 91001), conforme demonstrado por diferentes estudos de seqüenciamento (DENG *et al.*, 2002; PARKHILL *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2004).

Embora já tenha sido relatada a presença de seis regiões cromossômicas variáveis entre isolados de *Y. pestis* (RADNEDGE *et al.*, 2002), estudos mostram que o genoma do microrganismo é formado por regiões que são conservadas pelas diferentes cepas: um cromossomo de aproximadamente 4600 kb e três plasmídeos: pYV (70 kb); pFra (90-100 kb) e pPst (9,5 kb) (DENG *et al.*, 2002; PARKHILL *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2004).

2.3.1 O cromossomo

Possui cerca de 4600 kb e uma região de 102 kb conhecida como locus *pgm*, que contém dois segmentos física e funcionalmente distintos: Um segmento de pigmentação (locus *hms*) envolvido na captação da hemina pela bactéria que, *in vitro*, é evidenciado pelo fenótipo de pigmentação das colônias de *Y. pestis* cultivadas em meios ricos em hemina ou corantes análogos; e um segmento denominado ilha de alta patogenicidade (High Pathogenicity Island - HPI) que possui genes envolvidos na aquisição do ferro (PERRY & FETHERSON, 1997; SCHUBERT *et al.*, 2004).

O locus *hms* parece ser importante para a sobrevivência da *Y. pestis* na natureza e para a transmissão eficaz da peste das pulgas para os mamíferos. Ao picar um roedor contaminado, a pulga adquire a *Y. pestis*. No organismo do inseto o microrganismo absorve grandes quantidades de hemina e/ou ferro inorgânico provenientes do sangue ingerido, sofre multiplicação e forma agregados que causam o bloqueio do proventrículo (uma válvula que liga o esôfago ao intestino médio) impedindo a passagem normal dos alimentos. O bloqueio do proventrículo resulta no regurgitamento do conteúdo esofágico da pulga durante a picada do mamífero, o que contribui para a infecção de um novo hospedeiro (HINNEBUSH *et al.*, 1996).

A ilha de alta patogenicidade (HPI) é um segmento essencial para a patogenicidade das Yersinias, sendo amplamente distribuída entre os membros da família Enterobacteriaceae. Na *Y. pestis*, a HPI é uma região móvel (instável) constituída por genes responsáveis pela codificação do sideróforo quelante de ferro (Yersiniabactina

- Ybt), um poderoso sistema de aquisição de ferro importante para a sobrevivência do patógeno durante sua multiplicação no hospedeiro mamífero (CARNIEL *et al.*, 2001). Sobre o metabolismo de ferro (Fe) foi mostrado que a *Y. pestis* possui um eficiente sistema regulador da absorção, o chamado *Fur*. Através deste mecanismo, a bactéria regula a absorção do metal, de tal modo que a concentração intracelular seja mantida sempre dentro de níveis desejáveis. Em condições ricas em ferro, o *Fur* liga-se ao metal, adquire uma configuração capaz de se associar a seqüências alvo no DNA (*Fur Box*) e inibir da transcrição de genes-alvo. Sob condições de restrição de ferro, o *Fur* não se liga e os genes comumente responsáveis pela assimilação de ferro são expressos dotando a célula bacteriana da capacidade de retirar ferro de vários ambientes extracelulares (GAO *et al.*, 2008).

No cromossomo bacteriano é também encontrado um agrupamento de genes relacionados à biossíntese do lipopolissacarídeo (LPS), que é o principal componente da membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas. Em *Y. pestis*, o LPS é formado por duas porções: uma porção lipídica chamada lipídio A, que atua como uma âncora mantendo a molécula de LPS ligada à membrana externa; e uma cadeia curta de carboidratos (oligossacarídeos), que contém um segmento conservado típico de todas as cepas selvagens de enterobactérias, denominado núcleo interno. O LPS formado por cadeia de polissacarídeos e o antígeno O, que é característico das outras *Yersinias*, não aparece na *Y. pestis* devido a uma série de mutações no segmento de DNA codificante (KNIREL & ANISIMOV, 2012).

2.3.2 Plasmídeos de virulência

O plasmídeo pYV é o único encontrado nas três espécies de *Yersinia* patogênicas e codifica o sistema de secreção de tipo III (T3SS), um elaborado complexo protéico formado pelo antígeno LcrV e por seis proteínas efetoras (Yop E, Yop J, Yop M, Yop O, Yop H e Yop T) que atuam em conjunto regulando negativamente as respostas do hospedeiro à infecção (CORNELIS, 2002). Tem sido mostrado que o LcrV é um antígeno absolutamente necessário para a patogênese da peste bubônica e pneumônica em animais e humanos (SKRZYPEK & STRALEY, 1995).

O plasmídeo pFra codifica a proteína capsular F1 com atividade anti-fagocítica e a toxina murina (Ymt) (PERRY & FETHERSON, 1997) que parece estar envolvida na

transmissão da peste pelas pulgas (HINNEBUSCH *et al.*, 2002). A expressão da F1 depende de vários genes envolvidos na regulação (*caf1R*), na estrutura (*caf1*), no transporte (*caf1M*) e na montagem (*caf1A*) da proteína (GALYOV *et al.*, 1990; KARLYSHEV *et al.*, 1992). A F1 é imunogênica para homens e animais, sendo amplamente utilizada em testes de diagnóstico de peste (CHU, 2000).

O pPst codifica a proteína Pla que é precursora do ativador do plasminogênio e da coagulase (SODEINDE & GOGUEN, 1988) que parece atuar na disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro a partir do sítio da picada da pulga e no bloqueio do trato digestivo das pulgas (HINNEBUSCH *et al.*, 1996).

2.4 A resposta imune contra a *Yersinia pestis*

2.4.1 Resposta imune inata

Após a picada da pulga infectada, a *Y. pestis* é depositada na derme do hospedeiro mamífero e imediatamente células da imunidade inata são recrutadas para o sítio de inoculação do patógeno. A bactéria é então fagocitada pelos macrófagos, onde sobrevive e multiplica-se ativamente. Cerca de 6 a 12 h após a infecção, os macrófagos infectados começam a disseminar da derme para o linfonodo mais próximo onde rompem-se, liberando inúmeras bactérias que replicam-se extracelularmente e causam inchaço maciço do órgão, que passa a ser denominado bubão, característica clínica definitiva da forma bubônica da peste (AMADEI *et al.*, 2011).

A bacteremia inicial favorece a disseminação da bactéria pela corrente sanguínea e o desenvolvimento de uma infecção sistêmica que pode levar o estabelecimento de focos em todo o organismo (pele, pulmões, baço, fígado e sistema nervoso central) e a morte do indivíduo infectado (SHANNON *et al.*, 2013). Na vigência de complicações das formas bubônica e septicêmica tem-se a peste pneumônica do tipo secundária. A forma primária acontece por inalação direta de gotículas provenientes da respiração de humanos e animais doentes, principalmente os gatos (BRASIL, 2008; PRADEL *et al.*, 2015).

A *Y. pestis* é classificada como um patógeno intracelular facultativo pela sua notável capacidade de sobrevivência e crescimento nos meios intracelular e extracelular

(PERRY & FETHERSTON, 1997). Tem sido mostrado que durante a replicação nos macrófagos do hospedeiro mamífero (37°C), a *Y. pestis* passa a expressar vários fatores de virulência, que não eram expressos durante o crescimento na pulga (PUJOL & BLISKA, 2005). Estes fatores de virulência conferem resistência bacteriana à fagocitose por macrófagos e neutrófilos, tornam as bactérias resistentes à lise mediada pelas proteínas do complemento e ainda reprime a resposta pró-inflamatória, o que tem efeito direto na ativação das células da resposta imune adaptativa (AMADEI *et al.*, 2011).

Ao contrário dos macrófagos, que são considerados fagócitos permissivos para a sobrevivência e replicação da *Y. pestis*, os neutrófilos são capazes de controlar o crescimento do patógeno e matar a bactéria (PUJOL & BLISKA, 2005). Foi mostrado em estudo recente que, embora o genoma da *Y. pestis* codifique vários fatores de virulência anti-fagocíticos, a fagocitose da bactéria por neutrófilos tem sido observada e indica ainda que os polimorfonucleares infectados podem ser um caminho para a infecção não inflamatória de macrófagos (SPINNER *et al.*, 2014). Sabe-se que, ao fagocitar os patógenos, os neutrófilos liberam uma variedade de agentes microbicidas com capacidade para eliminar a maioria das bactérias presentes no meio extracelular (NAUSEEF, 2007). A fagocitose destas bactérias pode iniciar a apoptose dos polimorfonucleares (KOBAYASCHI *et al.*, 2003) que tem como resultado a expressão de moléculas de fosfatidilserina na sua membrana plasmática (BRATTON & HENSON, 2011). Esse resíduo exposto é provavelmente reconhecido por macrófagos, células dendríticas e outras células competentes (células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos), resultando na absorção e eliminação dos polimorfonucleares em apoptose, fenômeno denominado eferocitose (VAN *et al.*, 2012). Este modelo atual sugere que a fagocitose da *Y. pestis* por neutrófilos, em vez de obrigatoriamente estar sempre associada à morte, pode representar um mecanismo alternativo para a infecção não inflamatória de macrófagos via eferocitose (SPINNER *et al.*, 2014).

2.4.2 Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa é baseada no reconhecimento dos antígenos por linfócitos que ao serem ativados, sofrem expansão clonal e seletiva e geram uma

resposta imunológica específica e de longa duração. Sabe-se que a ativação dos linfócitos T e B depende não somente da interação do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) com o receptor de célula T (TCR) e o peptídeo, mas também de moléculas co-estimuladoras e de citocinas secretadas pelas células do sistema imune inato. A atuação da resposta imune adaptativa no combate à *Y. pestis* parece estar relacionada com a expansão de células T específicas produtoras de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que participam na ativação de fagócitos e com a resposta de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos que exercem lise direta das células infectadas pela bactéria (AMADEI *et al.*, 2011).

Tem sido mostrado que a *Y. pestis* interfere diretamente na imunidade adaptativa através da supressão da ativação dos linfócitos T que, por sua vez, reduzem a secreção de IFN- γ e TNF- α influenciando na atividade da imunidade inata (PARENT *et al.*, 2005). Parece que o antígeno V inibe a produção de IFN- γ e TNF- α , o que muito provavelmente indica que a imunidade celular mediada por citocina seja prejudicial para o patógeno (NAKAJIMA *et al.*, 1993).

Quanto à imunidade humoral, tem sido evidenciado que, após a infecção, a *Y. pestis* desencadeia a produção de uma série de anticorpos em pacientes e modelos experimentais e que estas proteínas desempenham papel importante na opsonização e neutralização dos fatores de virulência bacterianos durante a sua fase extracelular (TITBALL & WILLIAMSON, 2001). A relevância da imunidade humoral foi comprovada em um estudo que mostrou que amostras de soro de pacientes convalescentes para peste conferiu proteção a camundongos contra o desafio subcutâneo com *Y. pestis* (BASHAW *et al.*, 2007).

Os estudos sugerem que a resposta imune mediada por células e induzida por citocinas estaria associada com o *clearance* da *Y. pestis* intracelular, predominante nos estágios iniciais da infecção e os anticorpos estariam relacionados com o combate às bactérias extracelulares. Os anticorpos e as citocinas parecem atuar em conjunto com a resposta imune inata auxiliando os fagócitos a internalizar e destruir as bactérias causadoras de peste (GUPTA *et al.*, 2012).

2.5 Os fatores de virulência de *Yersinia pestis* e seus efeitos no hospedeiro

2.5.1 Sistema de secreção do tipo III

A inibição da fagocitose bacteriana parece estar associada ao sistema de secreção do tipo III (T3SS) exibido por *Y. pestis* e outras bactérias patogênicas do gênero *Yersinia* (NAVARRO *et al.*, 2005). O antígeno LcrV foi o primeiro componente do sistema de secreção a ser identificado em *Y. pestis* (BURROWS & BACON, 1956). Durante o desenvolvimento da infecção nos mamíferos, a bactéria aumenta a expressão das proteínas do T3SS e do LcrV, que forma um complexo na superfície do patógeno (AMADEI *et al.*, 2011). O LcrV exposto participa da injeção de proteínas efetoras (Yops) para dentro das células-alvo (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) inibindo as respostas imunes do hospedeiro (BYVALOV & OVODOV, 2011).

Além de bloquear ou impedir a ação das células fagocíticas, algumas Yops também inibem as respostas pró-inflamatórias produzidas pelas células infectadas. Estudos têm mostrado a participação das Yop J e Yop P na inibição da liberação de TNF- α por macrófagos (BYVALOV & OVODOV, 2011; LI & YANG, 2008), o que não só reduz a ativação das células natural killer (NK) e fagócitos, mas também destrói o ambiente inflamatório tão importante para a resposta imune adaptativa. A Yop O participa da apoptose de células imunes e epiteliais e a Yop M tem a capacidade de penetrar no núcleo da célula hospedeira e, eventualmente, inibir a produção de intermediários reativos de oxigênio pelos macrófagos (AMADEI *et al.*, 2011).

2.5.2 Lipopolissacarídeo

A elevada patogenicidade de *Y. pestis* parece estar relacionada com o LPS, especialmente o lipídio A, que é apontado como responsável pela maior parte dos efeitos fisiológicos em animais e seres humanos. Diferentes estudos sugerem que a parede celular da *Y. pestis* pode conter uma mistura de LPS estimuladores e não estimuladores do sistema imune, cuja expressão varia de acordo com a temperatura (MONTMINY *et al.*, 2006; REBEIL *et al.*, 2006). Parece que as bactérias crescidas no intestino das pulgas (temperatura entre 21 e 26°C) produzem o LPS típico na forma

hexa-acilada que é capaz de ativar a produção de citocinas pró-inflamatórias. Com a mudança de temperatura verificada após a transição para o hospedeiro mamífero (37°C), a bactéria imediatamente começa a produzir o LPS na forma tetra-acilada que não estimula a resposta imune. Parece que o lipídio A do LPS participa também da ativação de monócitos e macrófagos via receptor TLR4 (*Toll-like receptor*). As células ativadas secretam monóxido de nitrogênio, lipídios vasoativos e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) que, em excesso, levam ao choque séptico do hospedeiro (KNIREL & ANISIMOV, 2012).

2.5.3 Cápsula F1

A cápsula F1 apresenta atividade anti-fagocítica e diminui a captação da *Y. pestis* pelos macrófagos. Estudos recentes têm mostrado que a F1 parece atuar na inibição da adesão bacteriana às células epiteliais, sugerindo também a participação deste componente na transmissão de *Y. pestis* após a picada da pulga (LIU *et al.*, 2006; SEBBANE *et al.*, 2009).

2.6 Vacinas

Até o momento, vários esquemas vacinais contra a peste já foram descritos para uso humano. No entanto, os dados sobre eficácia clínica destas vacinas são limitados, tendo em vista à natureza esporádica dos surtos de peste e da histeria que podem cercá-los (WILLIAMSON & OYSTON, 2012).

Estudos mostram que os anticorpos podem não ser suficientes para proteger contra a forma pneumônica da infecção e, por este motivo, uma vacina efetiva precisa ativar não somente a imunidade humoral, mas também a imunidade celular do tipo Th1. Citocinas Th1 poderiam atuar diretamente na ativação da imunidade celular e/ou na reversão da imunossupressão induzida pela *Y. pestis*. A resposta imune do tipo Th1 atua em sinergia com a imunidade humoral e também age na geração de respostas de memória (GUPTA, *et al.*, 2012).

O primeiro relato de vacina para a peste foi, em 1897, quando Waldemar Haffkine desenvolveu uma preparação composta por colônias de *Y. pestis* mortas pelo calor, que se mostrou eficaz na proteção de coelhos contra a infecção experimental

(BANNERMAN, 1902). Na Índia, a vacina foi testada em humanos e, embora tenha sido notada redução da mortalidade em pessoas imunizadas, a alta frequência de reações adversas limitou sua aceitação (TITBALL & WILLIAMSON, 2001).

Em 1931, Georges Girard e Jean Robic desenvolveram uma vacina viva atenuada contra a peste, denominada EV. Esta preparação foi produzida a partir da cepa mutante de *Y. pestis* que sofreu a deleção do segmento do DNA cromossômico associado à patogenicidade, o locus HPI (COULANGES, 1983). A vacina administrada como uma dose única induziu em camundongos uma resposta imune que forneceu proteção contra desafios por via subcutânea ou por inalação (RUSSELL *et al.*, 1995; TITBALL & WILLIAMSON, 2001), o que parece sugerir que a imunização com EV protege contra a peste bubônica e pneumônica. A segurança da vacina no homem é questionável, tendo em vista que a cepa EV é virulenta. Em camundongos têm sido relatada uma taxa de mortalidade de cerca de 1% dos animais vacinados (RUSSELL *et al.*, 1995). Por estas limitações, o uso de EV é atualmente proibido nos Estados Unidos e na Europa (LI *et al.*, 2009).

Em 1939, foi desenvolvida uma variante da vacina de Haffkine, que foi chamada de USP ou Killed Whole-Cell - KWC (Células inteiras mortas). Esta nova preparação foi a primeira vacina para peste licenciada pelo FDA (Food and Drug Administration) e utilizava a bactéria inteira morta em formalina. A vacina foi considerada segura e eficaz na prevenção da peste bubônica (RUSSELL *et al.*, 1995) e, por este motivo, amplamente utilizada pelos militares norte-americanos durante a Guerra do Vietnã. Parece que esta nova versão era significativamente menos reatogênica do que aquela proposta por Haffkine, no entanto o relato de aparecimento de reações adversas (febre, dor de cabeça, linfadenopatia entre outras) e a necessidade de doses de reforço ao longo de um período de 6 meses diminuíram o interesse pela USP (QUENEE & SCHNEEWIND, 2009).

Além disso, mesmo tendo se mostrado efetiva contra a forma bubônica, a eficácia da USP na prevenção da peste pneumônica não foi comprovada, tendo sido relatados casos humanos de indivíduos imunizados com a vacina (MEYER, 1970), o que parece sugerir que as vacinas de células inteiras mortas não induzem resposta duradoura que forneça proteção contra a peste pneumônica. Por essa limitação e por questões de segurança e eficácia, este tipo de preparação vacinal não é mais aceito nos Estados Unidos (QUENEE & SCHNEEWIND, 2009).

Na última década, os esforços para desenvolver e testar novas vacinas têm sido focados nas subunidades recombinantes dos antígenos F1 e LcrV da *Y. pestis*, ambos fatores de virulência codificados por plasmídeos e capazes de induzir a produção de anticorpos durante a infecção natural e em modelos experimentais (AMADEI *et al.*, 2011).

Acredita-se que o mecanismo de proteção destas vacinas esteja associado aos anticorpos anti-F1 e anti-V (SIMPSON *et al.*, 1990) que, em conjunto, atuam bloqueando a entrega das Yops efetoras às células do hospedeiro facilitando a subsequente fagocitose da *Y. pestis*. (LI *et al.*, 2008).

Atualmente, as vacinas recombinantes baseadas em F1 e V estão sendo testadas quanto à segurança e imunogenicidade em seres humanos. Estudo recente descreveu uma preparação vacinal baseada na administração de F1 + V + adjuvante à base de alumínio em duas doses (uma delas *booster*) a 24 voluntários saudáveis, que surpreendentemente não relataram eventos adversos graves após a vacinação (WILLIAMSON *et al.*, 2005).

2.7 Diagnóstico da peste

O diagnóstico bacteriológico da peste é realizado mediante a cultura, o isolamento e a identificação da *Y. pestis* em diversas amostras de origem humana (aspirado de bubão, escarro, sangue e medula óssea) e de animais (sangue e vísceras), que são inoculadas em placas de ágar sangue (Blood Agar Base) e incubadas a 28°C por 48 a 72 h. O crescimento da *Y. pestis* é lento e após 48 h de incubação podem ser vistas colônias pequenas, translúcidas e brilhantes. Alternativamente, pode ser realizado também o cultivo da bactéria em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) com a incubação nas mesmas condições de temperatura anteriores. Neste caso, a bactéria exibe crescimento que pode ser visto como aspecto flocular do meio (sem turvação), após 24 a 48 h de incubação (CHU, 2000). O isolamento e a identificação da *Y. pestis* é considerada a técnica padrão-ouro para o diagnóstico de certeza da infecção (BRASIL, 2008).

A sorologia para a detecção de anticorpos contra o antígeno F1 da *Y. pestis* também desempenha um papel importante na confirmação do diagnóstico, especialmente quando o isolamento não foi bem sucedido ou quando somente a amostra de soro

está disponível (CHU, 2000). No Brasil, a hemaglutinação indireta é a técnica mais utilizada para o diagnóstico sorológico dos casos humanos, para o monitoramento da peste nos carnívoros domésticos (cães, gatos) e nos roedores (BRASIL, 2014). O teste permite a determinação qualitativa e quantitativa de anticorpos contra o antígeno F1 da *Y. pestis* através da utilização do mesmo protocolo de ensaio para as diferentes espécies de animais e humanos (CHU, 2000).

Embora seja simples, rápida e barata, a sensibilidade e especificidade da hemaglutinação nem sempre são satisfatórias (WILLIAMS *et al.*, 1982). A falta de especificidade do método pode ser, em parte, atribuída ao fato de que a técnica detecta todos os isotipos de anticorpos, incluindo a imunoglobulina M (IgM), que é de baixa especificidade (WILLIAMS *et al.*, 1986). Diante dessas limitações, outros testes já foram descritos na literatura como alternativa à hemaglutinação indireta, dentre eles o Elisa para o diagnóstico da peste em humanos, roedores (CAVANAUGH *et al.*, 1979), carnívoros domésticos e selvagens (WILLEBERG *et al.*, 1979).

Outro método descrito na literatura para diagnóstico da peste é o teste rápido (imunocromatográfico) desenvolvido pelo Instituto Pasteur de Madagascar. O teste, que permite a detecção do antígeno F1 em amostras de sangue, escarro e aspirado de bubão, consiste de uma fita reagente constituída por anticorpos monoclonais anti-F1 conjugados à uma substância cromógena. Do ponto de vista prático, trata-se de uma metodologia promissora, por ser de fácil e rápida execução e por dispensar o uso de automação. No entanto, o uso deste teste ainda é restrito (CHANTEAU *et al.* 2003). As técnicas moleculares permitem um rápido diagnóstico da peste, dispensam o cultivo das amostras e podem ser empregadas mesmo quando as bactérias não estão viáveis (ALMEIDA, 2015). Diversos protocolos com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações já foram desenvolvidas para o diagnóstico em material humano ou animal por meio da identificação de marcadores específicos, presentes nos plasmídeos e/ou no cromossomo de *Y. pestis* (CHASE *et al.*, 2005; LOIEZ *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

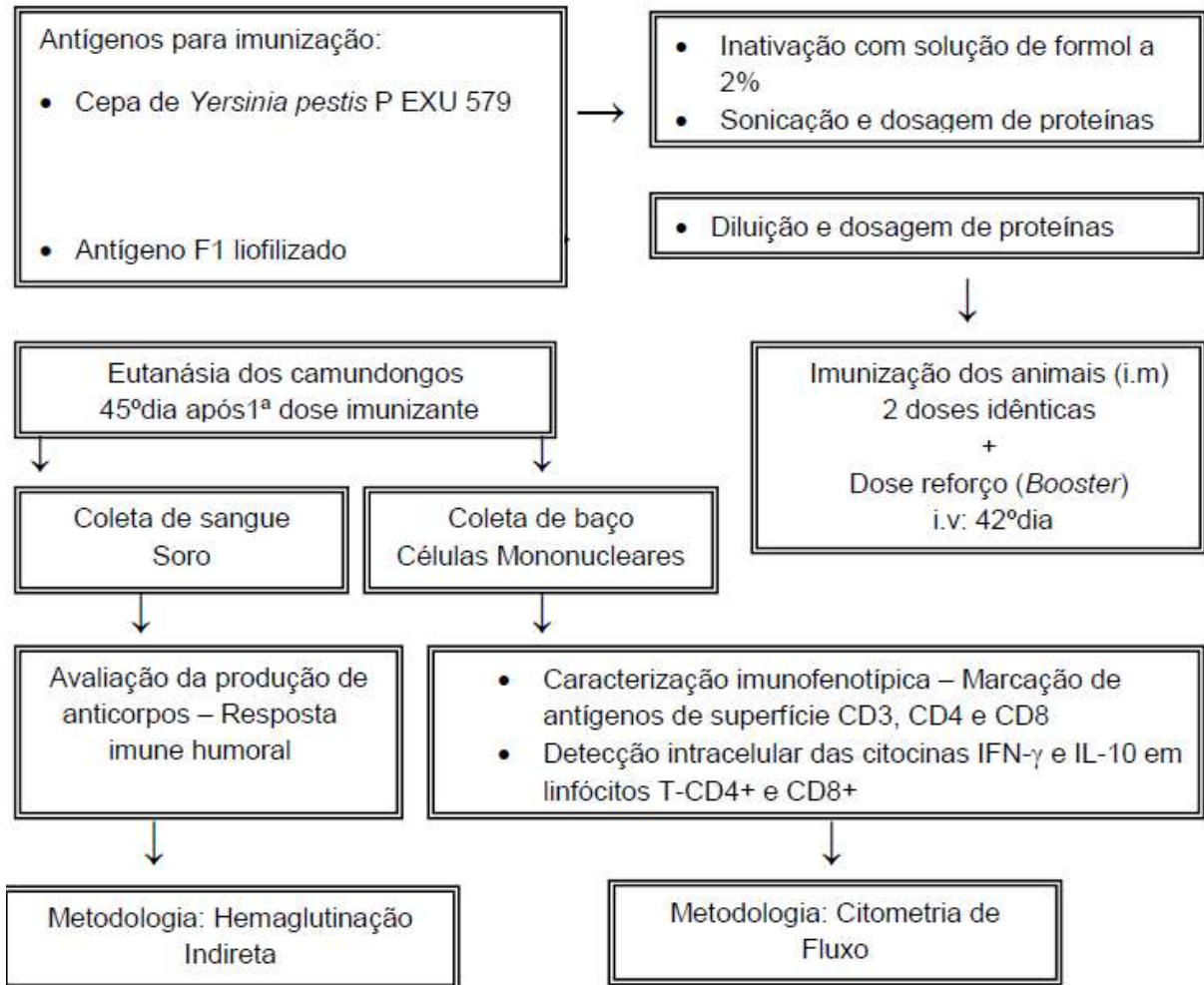
Avaliar a resposta imune humoral e celular após imunização de camundongos com antígenos de *Y. pestis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta imune humoral dos camundongos imunizados através da pesquisa de anticorpos contra o antígeno F1 de *Y. pestis* no teste de hemaglutinação indireta.
- Caracterizar imunofenotipicamente as subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 esplênicos após a imunização com antígeno total e purificado de *Y. pestis*.
- Determinar o perfil de citocinas produzido por linfócitos T CD4 e CD8 esplênicos após estímulo *in vitro* com antígeno total e purificado de *Y. pestis* por meio da quantificação intracitoplasmática de IFN- γ e IL-10 na citometria de fluxo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental



4.2 Animais de experimentação

4.2.1 Considerações éticas

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais, bem como o método de eutanásia escolhido e o número de camundongos usados nos experimentos foram aprovados pela comissão sob o protocolo nº148/2014, disponível no Anexo A. A manutenção e o manejo dos animais

foram conduzidos respeitando-se o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008).

4.2.2 Seleção da linhagem

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster (6-8 semanas de idade; 20-24 g) obtidos no biotério da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia/UFMG, temperatura aproximada de 22°C, ventilação, ciclo de claro/escuro de 12 h e acesso a ração e água *ad libitum*.

4.2.3 A eutanásia

O método de eutanásia escolhido foi a sobredosagem de anestésico geral, utilizando a combinação dos anestésicos cetamina-xilazina. O procedimento está em conformidade com as Diretrizes da Prática da Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (BRASIL, 2013), sendo indicado por causar morte rápida e indolor, sem necessidade de aparelhagem ou drogas de alto custo.

4.2.4 Tamanho da amostra

O cálculo do n amostral foi feito considerando-se o objetivo principal do experimento que foi detectar possíveis diferenças entre os grupos de tratamento e o grupo controle. Para esta determinação, foi utilizado o teste de hipóteses (modelo bicaudal) considerando um intervalo de 95% de confiança para a média (nível de significância de 5%) e um poder de teste de 80% (SAMPAIO, 2010). O desvio padrão e a diferença esperada para as médias também foram usadas neste cálculo e foram obtidos de estudos científicos semelhantes (QI *et al.*, 2010; CHU, 2000).

Foram utilizados os mesmos animais nos 3 experimentos realizados, totalizando 20 camundongos.

4.3 Cepa e antígeno F1 de *Yersinia pestis*

A suspensão bacteriana de *Y. pestis* (cepa P - EXU 579) inativada com formol e o antígeno F1 liofilizado (cepa não virulenta de *Y. pestis* A1122) foram preparados e gentilmente cedidos pela Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida do Serviço de Referência Nacional em Peste (SRP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM).

Para a produção da suspensão bacteriana foi utilizada a cepa isolada da hemocultura de um paciente humano do estado de Pernambuco. A cepa encontrava-se conservada em camada alta de gelose em câmara fria (4°C) na coleção de cultura de *Y. pestis* (FIOCRUZ- CYP). Para os trabalhos, a cepa foi reativada por semeio em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth, Difco), incubada à 28°C por 24 h e em seguida semeada em garrafas de Roux contendo meios de cultura apropriados e mantida à 37°C por 72 h (BALTAZARD *et al.*, 1956). Após reativação, a cepa foi distribuída em frascos do tipo penicilina contendo formol a 2% e encaminhada ao Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas (SDBF) do LACEN-MG. Após recebimento realizou-se o semeio de um pequeno volume da suspensão em placas contendo meio ágar base de sangue (BAB) e incubação à 28°C por 48 h. Após o período de incubação, não houve crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) evidenciando a morte do microrganismo pelo formol.

O antígeno F1 liofilizado foi também produzido pelo SRP da FIOCRUZ-Pernambuco, de acordo com procedimento descrito por BAKER *et al.*, 1952. Após o recebimento no SDBF/LACEN-MG o liofilizado foi diluído conforme as recomendações do SRP e distribuído em alíquotas que foram congeladas a -20°C até o momento do uso.

4.4 Preparo do extrato antigênico e do antígeno F1 de *Yersinia pestis*

A suspensão bacteriana inativada em formol foi sonicada por 90 segundos em 2 ciclos a 30 hertz e 2 ciclos a 60 hertz intercalados com banho de gelo. Após sonicação, o extrato antigênico foi esterilizado por radiação gama (dose de 5000 Gray por 2 h e 15 min.).

O antígeno F1 diluído foi também esterilizado por radiação gama nas mesmas condições do extrato antigênico de *Y. pestis* (dose de 5000 Gray por 2 h e 15 min.).

A concentração protéica do extrato antigênico e do antígeno F1 de *Y. pestis* foi determinada pelo método descrito por LOWRY *et al.* (1951).

4.5 Imunização dos animais

O esquema de imunização utilizado foi o descrito por QI *et al.* (2010), com modificações. Os camundongos foram imunizados com doses de 40 µg ou 20 µg de extrato antigênico de *Y. pestis* ou de F1, conforme distribuição apresentada na **Tabela 1**, por via intramuscular na região posterior da coxa, com 0,1 mL do respectivo extrato antigênico adicionado de hidróxido de alumínio em tampão PBS (25%, v/v) (QI *et al.*, 2010). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de hidróxido de alumínio em tampão PBS (grupo V). No 21º dia, uma nova dose idêntica à primeira foi administrada. Três dias antes da eutanásia dos animais (42 dias após o início da imunização) foi administrada uma dose reforço de 1/10 da inicial, sem adjuvante, via intravenosa (i.v.) na base da cauda (LADICS *et al.*, 1998).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos e esquema de imunização	
Grupos (n= 4 camundongos)	Esquema de imunização
1	40 µg Extrato total de <i>Y. pestis</i> + Al(OH) ₃
2	20 µg Extrato total de <i>Y. pestis</i> + Al(OH) ₃
3	40 µg antígeno F1 purificado + Al(OH) ₃
4	20 µg antígeno F1 purificado + Al(OH) ₃
5 (controle)	Al(OH) ₃ + PBS

Legenda: Al(OH)₃: Hidróxido de Alumínio

Após 45 dias da primeira dose imunizante, os camundongos foram eutanasiados por sobredosagem de anestésico geral. Imediatamente após a eutanásia, foi realizada a coleta de sangue para obtenção do soro e a remoção cirúrgica do baço que foram utilizados, respectivamente, nos ensaios de avaliação da resposta imune humoral e celular.

4.6 Avaliação da Resposta Imune Humoral

O sangue dos animais eutanasiados foi coletado da veia do plexo axilar, com o auxílio de pipeta de Pasteur. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 1763 g por 2 minutos. Os soros obtidos foram transferidos para tubos do tipo eppendorf e armazenados a -20°C até serem testados na hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos contra o antígeno F1 de *Y. pestis*.

4.6.1 Hemaglutinação indireta

A técnica de hemaglutinação indireta foi realizada de acordo com o protocolo de CHU, 2000. O teste compreendeu as etapas de inativação dos soros em banho-maria a 56°C, adsorção com hemácias de carneiro coletadas em solução de Alsever, diluição seriada dos soros (1:4 à 1:32) em placas de microtitulação (fundo em “U”) contendo salina com soro normal de coelho (1/100). Em seguida, foi adicionada solução de glóbulos vermelhos sensibilizados com a fração F1 de *Y. pestis* preparada de acordo com CHU, 2000. As amostras reagentes nas diluições 1:16 e 1:32 foram testadas até a diluição de 1:8132 e foi realizada também a inibição da hemaglutinação. No teste de inibição da hemaglutinação a diluição das amostras foi feita com solução contendo o antígeno F1 na concentração de 100 µg/mL, as demais etapas foram feitas de maneira idêntica à hemaglutinação. O resultado final foi expresso como a diferença entre o número de poços com aglutinação na hemaglutinação indireta e o número de poços com aglutinação na inibição da hemaglutinação. Amostras com títulos $\geq 1:16$ foram consideradas positivas para peste.

4.7 Avaliação da Resposta Imune Celular

Para avaliação da resposta imune celular foi realizada a imunofenotipagem de células mononucleares esplênicas e a marcação intracitoplasmática de citocinas produzidas pelas células esplênicas estimuladas ou não com antígenos de *Y. pestis* (extrato total e antígeno F1) e concavalina A (utilizada como controle positivo).

4.7.1 Obtenção de células mononucleares esplênicas

Após a eutanásia dos camundongos, os baços foram retirados em condições assépticas e imediatamente transferidos para uma placa de petri estéril contendo 5 mL do meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) onde foram picotados e macerados com auxílio de pinças e tesouras estéreis.

A suspensão de células obtida foi filtrada em filtro estéril de 0,45 µm (Millipore) e aplicada cuidadosamente em Fycoll-Hypaque (na proporção de 2:1), seguida de centrifugação a 441 g durante 35 minutos a 18°C. Após a centrifugação, o anel de células mononucleares formado foi retirado e transferido para um tubo do tipo falcon. Em seguida, o volume foi completado para 10 mL com RPMI 1640 e foi realizada uma nova centrifugação a 331 g, 7 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez de forma semelhante à anterior. Em seguida as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI 1640 para contagem do número de linfócitos viáveis.

4.7.2 Viabilidade das células esplênicas

O número de células mononucleares viáveis presente no baço de cada camundongo foi avaliado através da técnica de exclusão do Azul Trypan. Para isso as células foram diluídas 1:100 no respectivo corante e contadas em Câmara de Neubauer.

4.7.3 Caracterização imunofenotípica dos linfócitos esplênicos

Após a contagem dos linfócitos viáveis, foi preparada para cada animal uma suspensão contendo 1×10^6 células esplênicas/mL em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino, glutamina (Sigma), penicilina/estreptomicina 100UI/mL/50 pg/mL (Sigma). Esta suspensão de células foi usada tanto para realização da análise fenotípica dos linfócitos quanto para a detecção intracitoplasmática das citocinas.

Para realização da marcação dos antígenos CD3, CD4 e CD8, foi retirado parte do volume da suspensão de células anteriormente preparada e transferido para tubos de poliestireno (12x75mm) aos quais haviam sido adicionados previamente anticorpos anti-CD3 conjugado ao Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-CD4 conjugado ao

Clorofil de Peridina Cianina 5.5 (PerCP CY5.5) e anti-CD8 conjugado ao Aloficocianina (APC) (**Quadro 1**). Os tubos foram homogeneizados em agitador vórtex e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, foi adicionada solução tampão fosfato-salina (PBS - 0,0015M pH7,4) a cada tubo que, em seguida, foi centrifugado a 331 g por 7 minutos à 4°C. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento ressuspensionado em agitador vórtex e as células foram lavadas por mais 2 vezes com PBS, de forma semelhante à anterior. O sedimento formado foi ressuspensionado em agitador vórtex e foi adicionado PBS contendo 10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 (solução fixadora).

As células permaneceram em solução fixadora a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo (Forteza – Becton Dickinson). Os linfócitos foram especificamente analisados por “gating” seletivo com base nos parâmetros de tamanho e granulosidade das células. Como controles negativos foram empregados os respectivos isotipos controle (BD-Bioscience) marcados com os mesmos fluorocromos. A análise dos dados foi feita com o programa FlowJo.

Quadro 1 - Anticorpos usados na imunofenotipagem e na detecção intracelular de citocinas

Marcador	Fluorocromo	Clone	Funções
Anti-CD3e	FITC	145-2C11	Associado ao receptor de células T (TCR). Exigido para expressão na superfície celular e para transdução de sinal pelo TCR. Expresso em timócitos e linfócitos T
Anti-CD4	PerCP-Cy5.5	RM 4-5	Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos.
Anti-CD8a	APC	53-6.7	Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos e/ou supressores.
Anti-IFN- γ	PE-Cy7	XMG1.2	Citocina que desempenha importante papel da diferenciação de linfócitos T e B, macrófagos, células NK e outros tipos de células não hematopoiéticas. A produção de anti-IFN- γ é associada à diferenciação celular Th1.
Anti-IL-10	PE	JES5-16E3	Citocina produzida por vários tipos de células ativadas (células T CD4, T CD8, NK, macrófagos, células dendríticas, granulócitos entre outras).

Fonte: Anticorpos Monoclonais, BD-Bioscience.

4.7.4 Detecção intracitoplasmática das citocinas IL-10 e IFN- γ produzidas por células esplênicas estimuladas com antígenos de *Y. pestis*

Para detecção intracelular de citocinas, o restante da suspensão de células na concentração de 1×10^6 células esplênicas/mL de cada animal foi distribuída em placas de cultivo celular de 24 cavidades. Parte destas células não recebeu estímulo (cultura controle) e a outra parte foi estimulada com 25 μ g de concavalina A (Sigma) e com antígenos de *Y. pestis*. As placas foram incubadas à 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 72 h.

Quatro horas antes do término da incubação, as placas foram retiradas da estufa, foi adicionada a brefeldina A (BD-Bioscience) na concentração final de 10 μ g/mL e, em seguida, as células foram novamente incubadas por mais 4 horas nas mesmas condições de temperatura e tensão de CO₂. A brefeldina A utilizada assegura a retenção da citocina no interior da célula com acúmulo dentro do complexo de Golgi, promovendo um aumento do sinal que poderá ser melhor detectado pelo citômetro de fluxo.

Ao final das 72 h de incubação, as placas foram centrifugadas a 384 g por 10 minutos a 4°C e posteriormente as células, tanto estimuladas *in vitro* quanto não estimuladas, foram transferidas das cavidades das placas para respectivos tubos cônicos e centrifugadas a 331 g por 7 minutos a 4°C. Terminada a centrifugação, as células foram distribuídas nos respectivos tubos de poliestireno (12x75mm) e iniciou-se a marcação das moléculas de superfície CD3, CD4 e CD8, uma vez que a produção de citocinas foi avaliada nas subpopulações de linfócitos T CD3⁺-CD4⁺ e T-CD3⁺-CD8⁺. Para isso foram adicionados aos tubos contendo as células os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD3-FITC, anti-CD4-PercpCy55 e anti- CD8-APC e foi realizada uma incubação de 30 minutos ao abrigo da luz.

As células foram lavadas com solução de PBS contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica acompanhada de centrifugação a 331 g por 7 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram descartados, foi adicionado mais solução de PBS em cada tubo como descrito anteriormente, acompanhada de homogeneização em agitador vórtex. Em seguida, as células foram permeabilizadas com solução de PBS contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina. Esta etapa aconteceu sob incubação de 10 minutos na temperatura de 4°C ao abrigo da luz.

Terminada a incubação, todos os tubos foram centrifugados a 331 g por 7 minutos a 4°C e os sobrenadantes obtidos foram descartados.

Posteriormente, foram adicionados aos tubos contendo as células os anticorpos monoclonais citocina-específicos anti-IFN- γ conjugado a ficoeritrina cianina (PeCy7) e anti-IL-10 conjugado a ficoeritrina(PE), ambos da marca BD-Bioscience (**Quadro 1**). Seguiu-se nova incubação ao abrigo de luz por 30 minutos. Após o período de incubação, foi adicionado aos tubos solução de PBS contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina que foram imediatamente homogeneizados em agitador vórtex e submetidos à centrifugação a 331 g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com solução de PBS contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica, empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Em seguida, as células foram fixadas com solução contendo 10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio pH 7,2 e acondicionadas a 4°C ao abrigo da luz até o momento da leitura.

A caracterização das células foi feita no citômetro de fluxo (Forteza-Becton Dickinson) utilizando o programa FlowJo para aquisição e análise dos dados.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do software R para comparação entre os grupos. Para comparação dos marcadores de superfície foi utilizada a Análise de Variância (Anova) baseada na estatística de Fisher. O intervalo de confiança foi definido como 95% e em todos os casos as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da resposta imune humoral

Para caracterizar a resposta imune humoral induzida pela imunização com diferentes doses (40 µg e 20 µg) do extrato total ou do antígeno F1 purificado de *Y. pestis*, os títulos de anticorpos anti-F1 foram avaliados no soro dos camundongos imunizados e dos animais do grupo controle no 45º dia após a imunização primária através da hemaglutinação indireta, que é o único teste padronizado no Brasil para o diagnóstico sorológico da peste em pacientes humanos e animais infectados.

O experimento foi iniciado com 20 camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster, igualmente distribuídas entre os 4 grupos de tratamento e o grupo controle.

Serão apresentados os resultados de 16 análises em decorrência de problemas ocorridos durante a coleta de sangue de 4 animais, que resultou em um volume insuficiente de soro para análise na hemaglutinação indireta.

Na Tabela 2 são mostrados os títulos de anticorpos de todos os animais avaliados no estudo. Foi verificado que os animais do grupo 1 e 2, imunizados com o extrato total de *Y. pestis* nas doses de 40 µg e 20 µg, não apresentaram anticorpos anti-F1 detectáveis no teste. O mesmo comportamento foi observado para os animais do grupo controle, imunizados com o adjuvante hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluído em PBS.

Por outro lado, foi verificado que todos os animais imunizados com o antígeno F1 purificado, tanto na dose de 40 µg quanto na dose de 20 µg, apresentaram resultados positivos, ou seja, títulos maiores ou iguais a 1/16 no teste de hemaglutinação indireta. As respostas dos animais imunizados com 40 µg de F1 (grupo 3) foram bem heterogêneas, com títulos variando desde 1/16 (ponto de corte) até 1/8132 (a mais alta diluição de soro testada). O mesmo comportamento pôde ser observado entre os animais imunizados com 20 µg da proteína F1 (grupo 4). Embora em menor número, esses animais, também mostraram resposta que variou em dois títulos (1/64 e 1/256).

Tabela 2 - Títulos de anticorpos anti-F1 obtidos na hemaglutinação indireta

Grupo de Tratamento	Animal	Imunização	Resultado (Título de anticorpos anti-F1)
1	1	40 µg extrato total de <i>Y. pestis</i>	Negativo
	2	40 µg extrato total de <i>Y. pestis</i>	Negativo
	3	40 µg extrato total de <i>Y. pestis</i>	Negativo
	4	40 µg extrato total de <i>Y. pestis</i>	Negativo
2	5	20 µg extrato total de <i>Y. pestis</i>	Negativo
	6	20 µg extrato total de <i>Y. pestis</i>	Negativo
	7	20 µg extrato total de <i>Y. pestis</i>	Negativo
3	8	40 µg antígeno F1	Positivo: Título 1/16
	9	40 µg antígeno F1	Positivo: Título 1/128
	10	40 µg antígeno F1	Positivo: Título 1/8132
3	11	40 µg antígeno F1	Positivo: Título 1/2048
4	12	20 µg antígeno F1	Positivo: Título 1/256
	13	20 µg antígeno F1	Positivo: Título 1/64
5	14	PBS + Adjuvante	Negativo
	15	PBS + Adjuvante	Negativo
	16	PBS + Adjuvante	Negativo

5.2 Análise fenotípica dos linfócitos T esplênicos

Com o propósito de investigar as respostas de células T foram avaliadas também as subpopulações de linfócitos T esplênicos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ dos camundongos imunizados e não imunizados (grupo controle) no 45º dia após a imunização através da técnica de citometria de fluxo. Os resultados referem-se a um n amostral igual a 20 camundongos, igualmente distribuídos entre os 4 grupos de imunização e o grupo controle.

A Tabela 3 representa as médias aritméticas e o desvio padrão de 4 animais por grupo. Para cálculo da média, foi considerada a porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ de cada animal dentro de um mesmo grupo e o número total de animais por grupo. É possível observar que a média destas células não varia entre os diferentes grupos estudados.

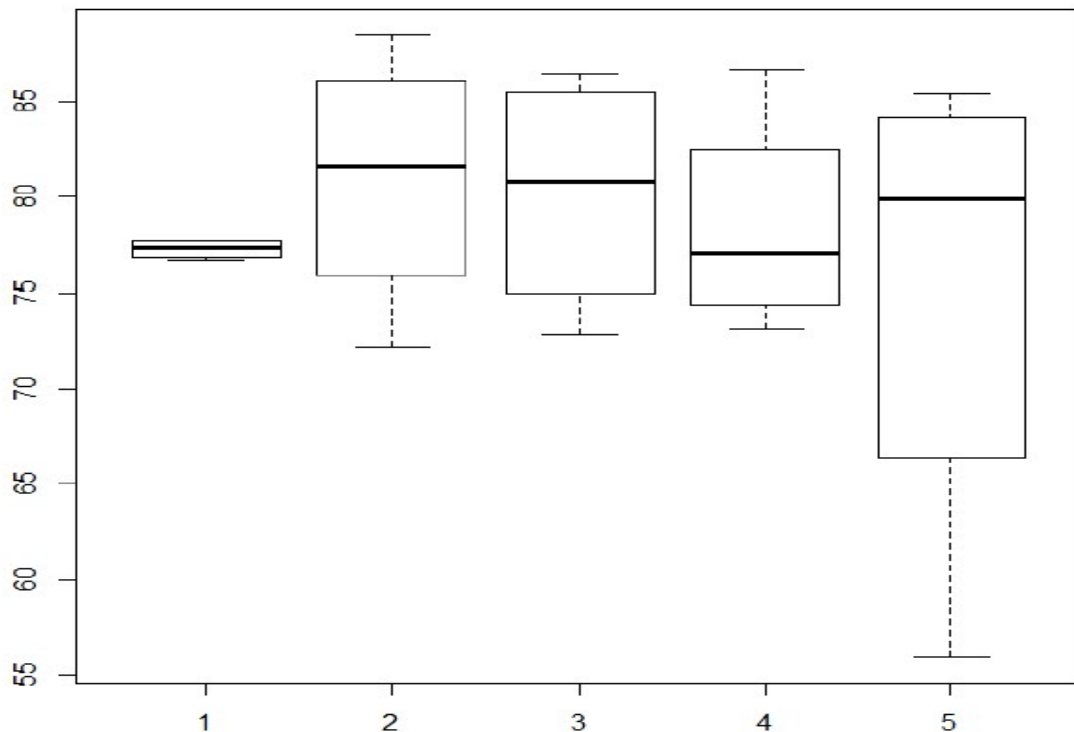
A Figura 1 ilustra os resultados obtidos para os linfócitos T CD3⁺-CD4⁺ nos grupos de imunização e no grupo controle (Grupo 5). Os valores foram calculados como percentuais, levando-se em consideração a população de linfócitos totais. A princípio, a dispersão da variabilidade no grupo 1, sugere considerável diferença em relação ao grupo controle, no entanto foi verificado através da análise de variância (Anova) feito

para as médias dos grupos que não existe diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Porcentagem das subpopulações de linfócitos T CD3⁺-CD4⁺ e T CD3⁺-CD8⁺, por grupo, no 45º dia de imunização com extrato total e o antígeno F1 purificado, de *Y. pestis* (n = 4 animais)

Grupo	Linfócito	Média	Mediana	Desvio Padrão
1	TCD3 ⁺ -CD4 ⁺	77,25	77,30	0,52
	TCD3 ⁺ -CD8 ⁺	14,57	14,60	0,84
2	TCD3 ⁺ -CD4 ⁺	80,97	81,60	6,89
	TCD3 ⁺ -CD8 ⁺	11,80	12,39	5,87
3	TCD3 ⁺ -CD4 ⁺	80,20	80,80	6,36
	TCD3 ⁺ -CD8 ⁺	9,23	7,68	6,72
4	TCD3 ⁺ -CD4 ⁺	78,45	77,05	5,85
	TCD3 ⁺ -CD8 ⁺	11,53	11,07	7,57
5	TCD3 ⁺ -CD4 ⁺	75,28	79,90	13,40
	TCD3 ⁺ -CD8 ⁺	14,50	10,20	13,27

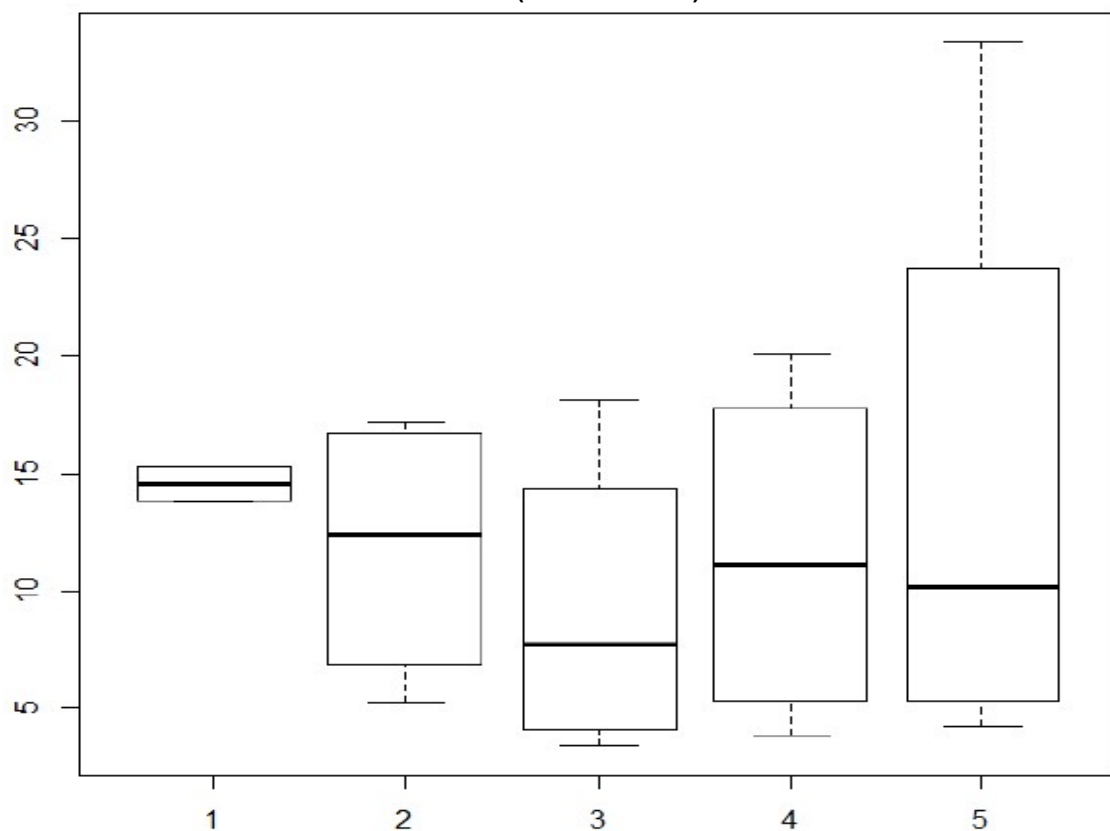
Figura 1 - Determinação do perfil *in vivo* de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) de camundongos fêmeas Swiss Webster (n = 4 animais) após imunização com extrato total e antígeno F1, de *Y. pestis*



A Figura 2 representa os resultados obtidos para os linfócitos T CD3⁺-CD8⁺. Os valores foram calculados como percentuais, levando-se em consideração a população de linfócitos totais. Em conformidade com os achados para T CD3⁺-CD4⁺ é possível

observar claramente a homogeneidade dos valores de linfócitos T CD3⁺-CD8⁺ obtidos no grupo 1, indicado pelo menor deslocamento da caixa. Os valores médios obtidos em todos os grupos são bem semelhantes. A dispersão da variabilidade no grupo 1, a princípio sugere grande diferença em relação ao grupo controle, no entanto foi verificado através da análise de variância (Anova) feito para as médias dos grupos que não existe diferença estatística entre os tratamentos ($p>0,05$).

Figura 2 - Determinação do perfil *in vivo* de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) de camundongos fêmeas Swiss Webster após imunização com extrato total e antígeno F1, de *Y. pestis* (n = 4 animais)



5.3 Detecção intracitoplasmática das citocinas IL-10 e IFN- γ

Para investigar a resposta das células T-CD4⁺ e T-CD8⁺ frente ao estímulo *in vitro* com extrato total e antígeno F1 de *Y. pestis*, células mononucleares esplênicas dos camundongos imunizados obtidas no 45º dia após a imunização primária, foram cultivadas e avaliadas, pela técnica de citometria de fluxo, quanto a produção de IFN- γ e IL-10.

Os resultados mostrados a seguir referem-se a um n amostral igual à 19 camundongos, distribuídos entre os grupos de imunização e o grupo controle. Vale ressaltar que o grupo 1 é representado por n = 3 animais, como consequência da contaminação da cultura das células de um dos camundongos deste grupo. As médias dos valores obtidos para os animais imunizados serão comparadas com aquelas dos animais não imunizados, que serviram como controles.

As Figuras 3 e 4 mostram, respectivamente, a influência do extrato total de *Y. pestis* na produção das citocinas IFN- γ e IL-10 pelos linfócitos T-CD4⁺ nos diferentes grupos de imunização e no grupo controle. Na Figura 3, é possível observar que o percentual de células T expressando IFN- γ no grupo 1 mostra-se consideravelmente mais elevado, enquanto que os demais grupos exibem valores semelhantes ao controle. Na Figura 4, um maior percentual de células T expressando IL-10 é notado nos grupos 1 e 2.

Apesar das variações encontradas, foi verificado que não existe diferença estatística ($p > 0,05$) entre os percentuais de linfócitos T-CD4⁺ produtores de IFN- γ e IL-10 dos animais imunizados e não imunizados (controle) após estímulo com extrato total de *Y. pestis*.

Figura 3 - Produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com extrato total de *Y. pestis*

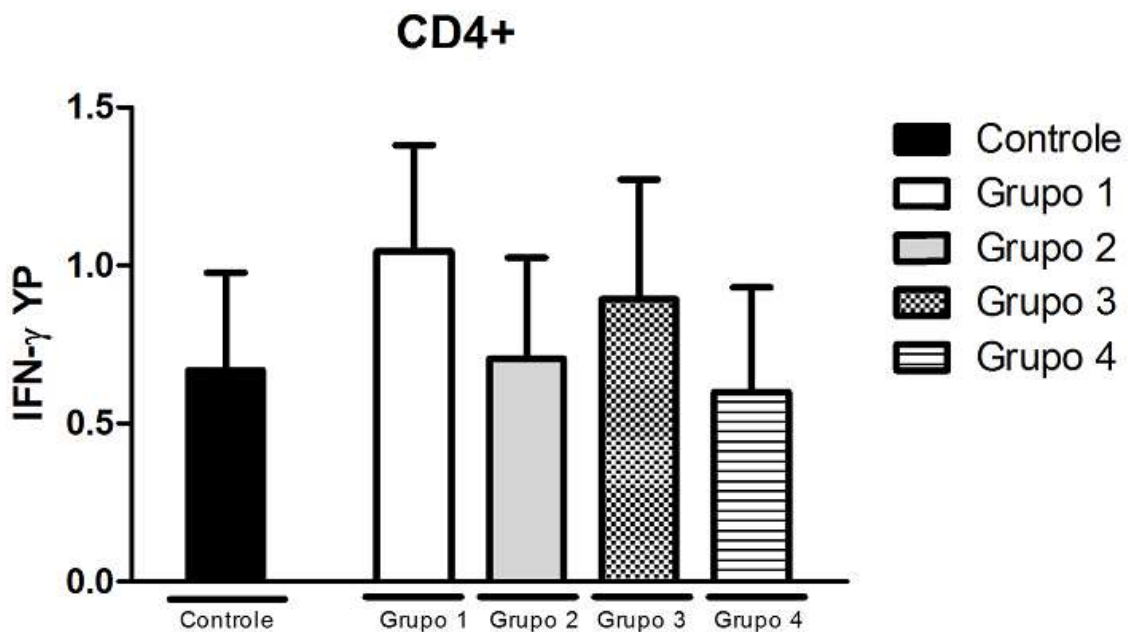
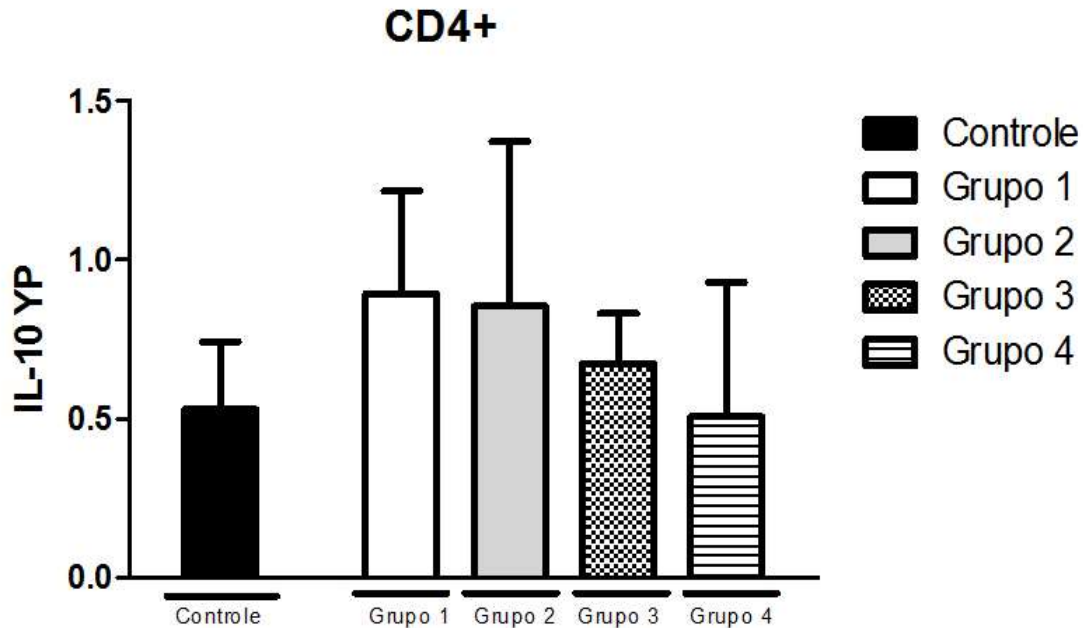


Figura 4 - Produção da citocina IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com extrato total de *Y. pestis*



As Figuras 5 e 6 mostram, respectivamente, a influência do antígeno F1 de *Y. pestis* na produção das citocinas IFN- γ e IL-10 pelos linfócitos T-CD4⁺ nos diferentes grupos de imunização e no grupo controle. Primeiramente, pode-se verificar que as respostas geradas pelo estímulo *in vitro* com o antígeno F1 são reconhecidamente menores quando comparadas com aquelas induzidas pelo extrato total de *Y. pestis* (**Figuras 3 e 4**). É possível observar claramente que, em todos os grupos de imunização, não houve variação no percentual de células T expressando IFN- γ e IL-10 quando comparado com o grupo controle. Foi verificado que não existe diferença estatística ($p > 0,05$) entre os percentuais de linfócitos T-CD4⁺ produtores de IFN- γ e IL-10 dos animais imunizados e não imunizados (controle) após estímulo com antígeno F1 de *Y. pestis*.

Figura 5 - Produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com antígeno F1 *Y. pestis*

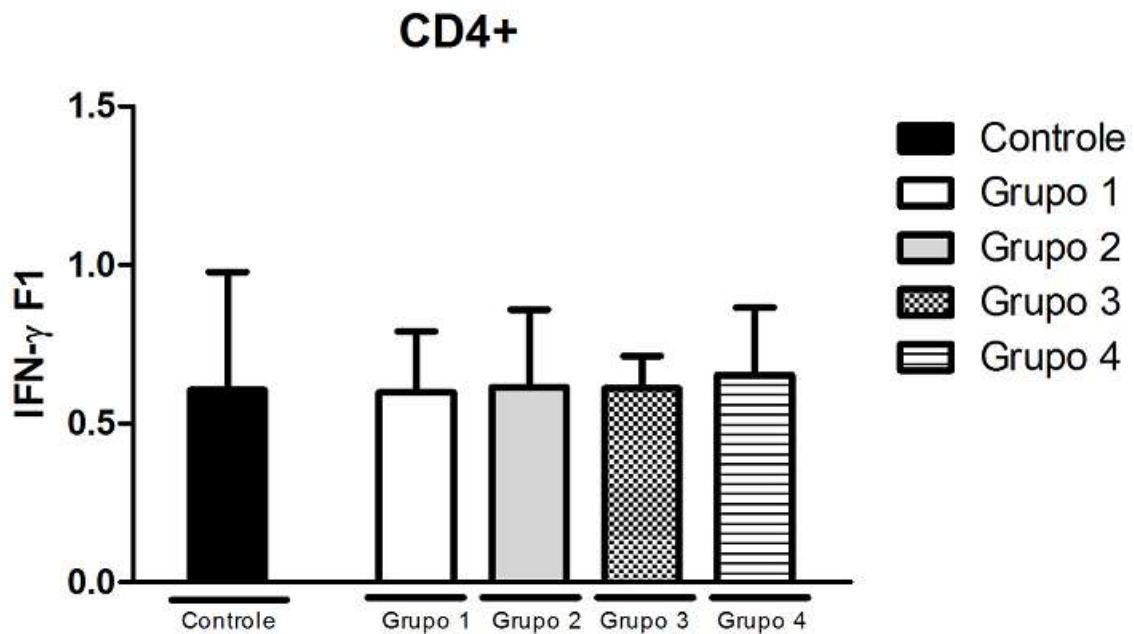
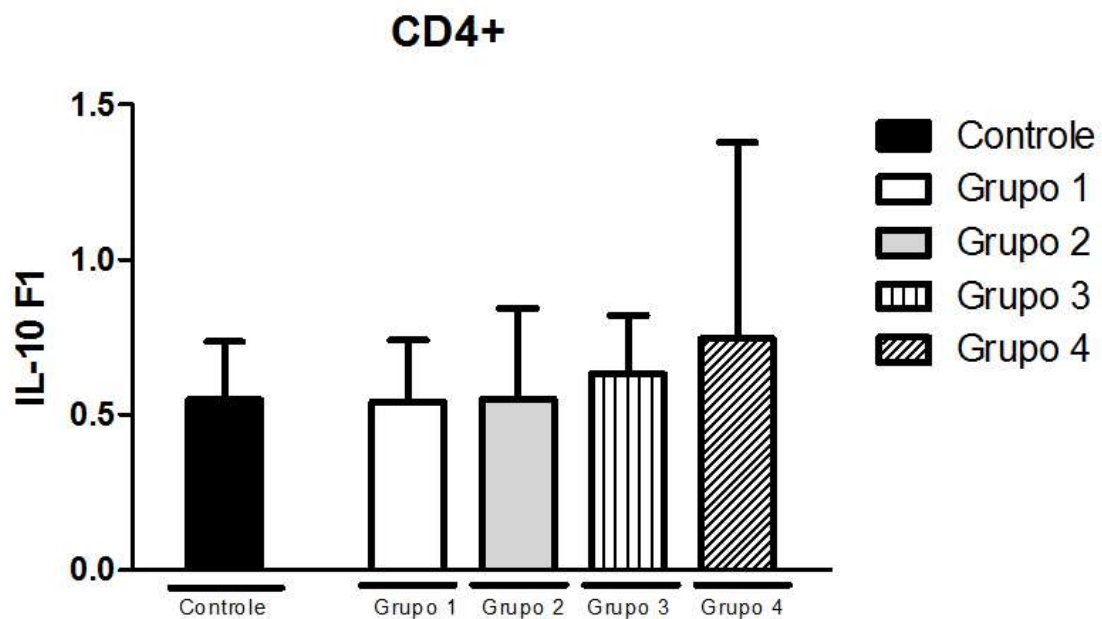


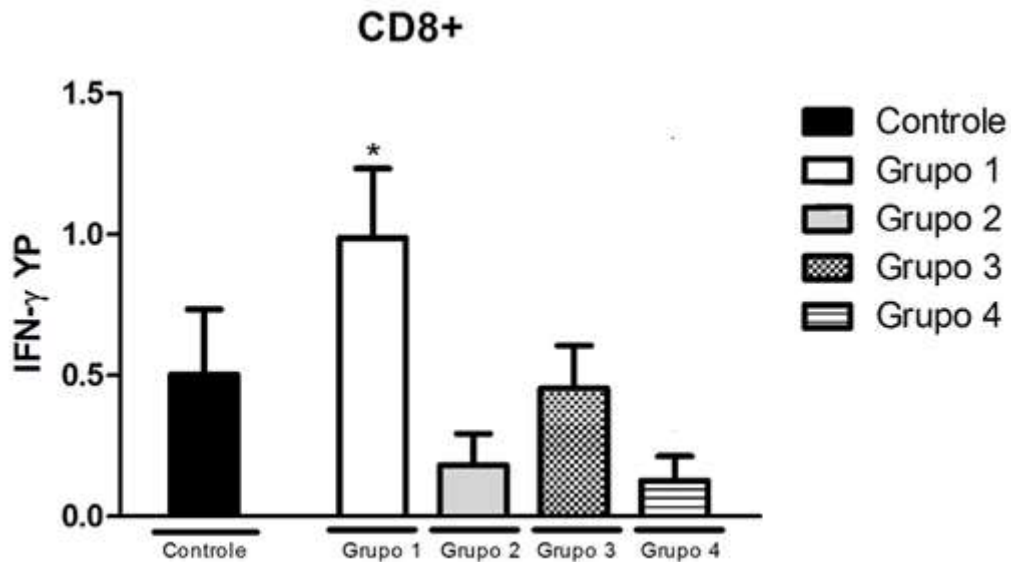
Figura 6 - Produção da citocina IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com antígeno F1 *Y. pestis*



A Figura 7 mostra a influência do extrato total de *Y. pestis* na produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T-CD8⁺. É possível observar claramente que o percentual de células T expressando IFN- γ mostra-se consideravelmente mais elevado no grupo 1, quando comparado com o grupo controle. Esta diferença verificada foi considerada

estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o que pode ser um indício da influência do extrato total de *Y. pestis* na geração de uma resposta Th1 mediada pelos linfócitos T-CD8⁺.

Figura 7 - Produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com extrato total de *Y. pestis*. *Significativo em relação ao controle ($p < 0,05$)



A Figura 8 representa o comportamento dos linfócitos T-CD8⁺ produtores de IFN- γ nos diferentes grupos de imunização e no controle frente ao estímulo *in vitro* com o antígeno F1 de *Y. pestis*. É possível verificar que somente o grupo 1 apresenta valores percentuais maiores que o grupo controle. Porém, foi verificado que não existe diferença estatística ($p > 0,05$) entre os percentuais de linfócitos T-CD8⁺ produtores de IFN- γ dos animais imunizados e não imunizados (controle) após estímulo com antígeno F1 de *Y. pestis*.

Figura 8 - Produção da citocina IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ esplênicos após estímulo *in vitro* com antígeno F1 *Y. pestis*

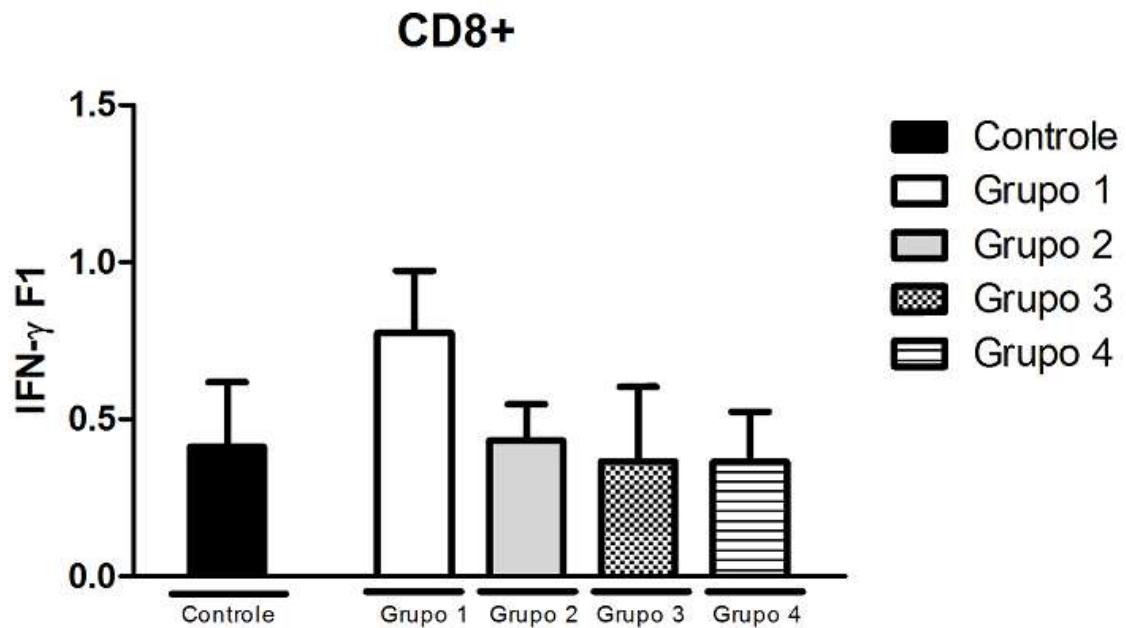
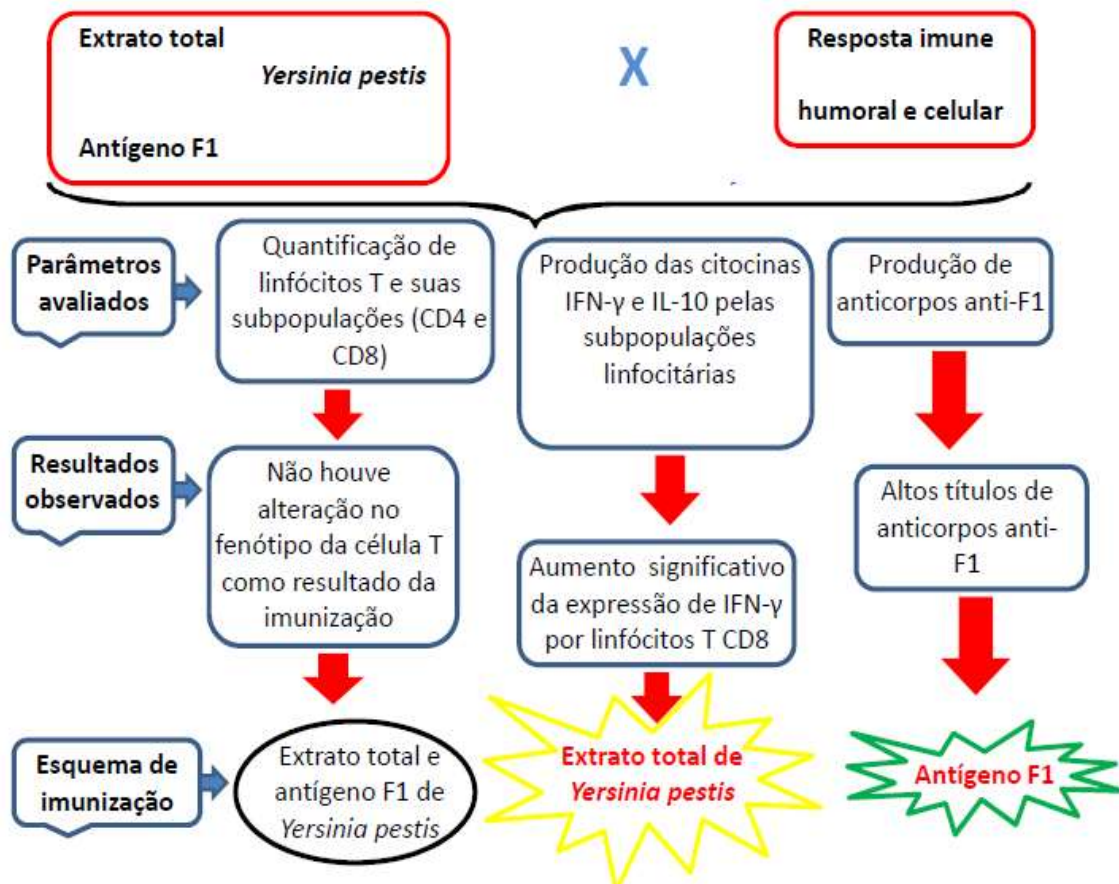


Figura 9 - Esquema representativo dos parâmetros avaliados no presente trabalho e os respectivos resultados obtidos



6 DISCUSSÃO

Inicialmente destinou-se avaliar a produção de anticorpos após imunização de camundongos com o extrato total ou com antígeno F1 purificado de *Y. pestis*, nas doses de 40 µg ou 20 µg, utilizando o hidróxido de alumínio como adjuvante. O esquema de imunização adotado no nosso estudo foi baseado naquele proposto por Qi *et al.* (2010) que, de forma semelhante, avaliou a eficácia protetora das vacinas constituídas pelas proteínas F1+V de *Y. pestis* na proteção de camundongos contra o desafio subcutâneo com a cepa virulenta da bactéria.

Os resultados obtidos no nosso estudo mostraram claramente que os animais imunizados com a proteína F1 adsorvida com o adjuvante hidróxido de alumínio exibiram uma resposta humoral robusta, conforme verificado pelos altos títulos de anticorpos anti-F1 na hemaglutinação indireta (**Tabela 2**). Foi observado que, até mesmo os animais que receberam a menor dose de F1 (20 µg) apresentaram títulos > 1:16, que é o ponto de corte para reação de hemaglutinação indireta para peste. Os nossos achados estão em conformidade com aqueles descritos por Qi *et al.* (2010) que, de maneira semelhante, constatou que uma dose de 20 µg de F1 em associação com hidróxido de alumínio gerava títulos de IgG significativamente elevados em camundongos e que os níveis destes anticorpos permaneciam detectáveis no soro dos animais por até 126 dias de observação, quando duas doses de imunização foram utilizadas.

As vacinas de subunidades baseadas nas proteínas F1 e V de *Y. pestis* têm sido foco de diversas pesquisas que, embora reconheçam o valor do antígeno V na proteção contra cepas não-encapsuladas da bactéria, ressaltam a importante contribuição da F1 na indução de uma resposta imune precoce. Com relação a essa propriedade, Levy *et al.* (2011) em seu estudo para caracterização da resposta imune de camundongos após imunização com a proteína F1 verificou, através de um teste de Elisa quantitativo, que no dia 1 após a vacinação os anticorpos IgM-anti-F1 já podiam ser detectados no soro de alguns animais imunizados e no dia 3 após a imunização foi demonstrado também o início do aparecimento de IgG-anti-F1.

A capacidade dos anticorpos anti-F1 para fornecer proteção efetiva contra a peste bubônica já foi comprovada experimentalmente em diferentes estudos. Levy *et al.* (2011) verificaram que camundongos imunizados com F1 exibiram 100% de

sobrevivência após desafio subcutâneo com cepa virulenta de *Y. pestis*. Dinc *et al.* (2014) relataram uma taxa de sobrevivência de 80% dos animais vacinados com F1 recombinante em associação com o antígeno V.

Em estudo sobre vacinas contra peste bubônica e pneumônica Titball & Williamson (2001) comentaram que a imunogenicidade das proteínas F1 e V recombinantes pode ser máxima, na medida em que suas conformações forem o mais semelhante às proteínas nativas. Esta constatação pode também explicar os altos títulos de anticorpos verificados no nosso estudo, tendo em vista que o antígeno utilizado na imunização foi obtido a partir da cepa de *Y. pestis* e não através de técnicas de DNA recombinante.

O uso do hidróxido de alumínio como adjuvante também poderia justificar os resultados de resposta imune humoral obtidos. Outros estudos já reportaram que as vacinas de subunidades constituídas pelos antígenos F1 e V em associação com hidróxido de alumínio induzem uma resposta predominante para a IgG1 tanto em camundongos quanto em seres humanos (QI *et al.*, 2010; WILLIAMSON *et al.*, 1997). No entanto, por limitações inerentes ao teste sorológico utilizado neste estudo, não foi possível determinar a classe, sequer a subclasse de imunoglobulina, induzida pela imunização.

Conforme esperado, foram observados títulos de anticorpos variáveis entre os animais de um mesmo grupo. Tal resultado pode ser atribuído à linhagem de camundongos utilizada no estudo. Optou-se pelo modelo experimental com camundongos Swiss Webster, animais geneticamente heterogênicos/outbreeds (CHIA *et al.*, 2005), que provavelmente responderam de formas diferentes ao estímulo recebido. A intenção com essa escolha foi adotar um modelo que pudesse refletir a real eficácia da nossa vacina, tendo em vista uma possível variabilidade de resposta entre indivíduos de uma população.

Deve ser destacada também a ausência de resposta imune humoral dos animais imunizados com o extrato total de *Y. pestis* em ambas as doses, indicando que o referido esquema não induziu a produção de anticorpos anti-F1 nesses grupos, o que faz supor que o extrato total não continha uma concentração suficiente de F1 capaz de induzir resposta imune humoral nos camundongos.

O papel dos anticorpos na proteção contra a *Y. pestis* já foi previamente comprovado por diferentes estudos (ANDERSON *et al.*, 1997; HILL *et al.*, 2006). Dinc *et al.* (2014),

por outro lado, mostraram que os anticorpos sozinhos podem não ser suficientes para a completa proteção mediada pelas vacinas de subunidades. Em seu estudo de imunização, foi observado que 80% dos camundongos vacinados com o esquema F1 e V foram protegidos contra o desafio com *Y. pestis*, no entanto 20% deles não sobreviveram, embora apresentassem altas taxas de anticorpos. Este achado sugere que a defesa contra a *Y. pestis* não é mediada exclusivamente pelos anticorpos, depende também do envolvimento de células T e suas citocinas.

A técnica de imunofenotipagem utilizada neste estudo teve como objetivo quantificar as subpopulações de linfócitos T esplênicos a fim de verificar possíveis alterações nos percentuais dessas células em resposta ao estímulo antigênico recebido. Os resultados encontrados revelaram nitidamente um predomínio de células T-CD4⁺ em todos os grupos estudados (**Tabela 3**). De modo semelhante, Araújo (2012) também observou uma porcentagem maior de células T-CD4⁺ em relação a T-CD8⁺ ao realizar a imunofenotipagem de linfócitos T de camundongos da linhagem Swiss Webster. Contudo, os valores de T-CD4⁺ aqui encontrados foram mais elevados que àqueles observados por Araújo (2012), o que pode ser justificado pelo fato de que as células T quantificadas no nosso experimento foram obtidas do baço dos camundongos e não do sangue periférico como analisado por Araújo (2012). A análise estatística dos resultados da imunofenotipagem revelou que não existe diferença estatística ($p > 0,05$) nos percentuais dos linfócitos T entre diferentes grupos o que pode sugerir, que não houve proliferação em resposta ao estímulo antigênico.

O terceiro experimento destinou-se a avaliar a expressão das citocinas IFN- γ e IL-10 nos linfócitos T CD4⁺ e IFN- γ nas células T CD8⁺ em decorrência do estímulo antigênico *in vitro*. Foi verificado que o extrato total de *Y. pestis* foi capaz de induzir uma maior expressão de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ apenas no grupo 1 (**Figura 3**). Embora não seja significativo estatisticamente, esse resultado aumentado não deve ser negligenciado, pois é uma forte indicação de ativação de células T exibida somente nos animais que foram imunizados com a maior dose do extrato total bacteriano. Neste contexto, acredita-se que a alteração do regime de imunização, com o aumento ou a inclusão de mais uma dose vacinal, poderia representar uma alternativa plausível para a melhoria da resposta imune celular.

De modo semelhante, foi verificado que o extrato total de *Y. pestis* induziu uma discreta produção de IL-10 em linfócitos T CD4⁺, no entanto essa resposta não foi

considerada estatisticamente significativa em relação ao controle. Foi constatado um maior percentual de células T expressando IL-10 nos grupos 1 e 2 (**Figura 4**). Estes resultados, a princípio, poderiam sugerir uma resposta voltada para Th2, o que só poderia ser de fato confirmado com a dosagem de outras citocinas como IL-4, IL-5 e IL-6. Levando-se em consideração a importância dos perfis Th1 e Th2 na proteção contra a *Y. pestis* e ainda a possibilidade de direcionamento da resposta imune com o uso de adjuvantes apropriados, torna-se cada vez mais necessária a pesquisa por novas moléculas co-estimulatórias com potencial para indução de uma resposta mista baseada tanto na produção de anticorpos quanto de citocinas, o que representaria uma inovação importante no campo das pesquisas de vacinas para a peste.

Com relação à influência do antígeno F1 na ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ para a produção de citocinas, verificou-se que não houve diferença estatística entre os animais imunizados e o grupo controle. Além disso, constatou-se que as respostas de células T induzidas pela proteína F1 purificada foram reconhecidamente menores quando comparadas com aquelas induzidas pelo extrato total de *Y. pestis* (**Figuras 5, 6 e 8**). Este achado está em conformidade com os resultados encontrados por Li *et al.* (2009) que, da mesma forma, observaram que o antígeno F1 não é capaz de induzir uma forte resposta celular em animais imunizados com a vacina viva atenuada EV76, o que sugere fortemente que a proteína F1 pode não ser um antígeno dominante para células T.

As análises estatísticas referentes a detecção intracelular de IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ evidenciaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo 1 e o controle (**Figura 7**), o que pode sugerir a influência do extrato total de *Y. pestis* na geração de uma resposta Th1 mediada por essa subpopulação celular. Este achado é de grande importância considerando-se que a proteção do linfócito T CD8 está relacionada com a capacidade de produção das citocinas IFN- γ e TNF- α que, atuam na ativação de macrófagos e neutrófilos que, por sua vez, exibem aumento da produção de intermediários reativos de oxigênio o que seria de notável importância para o controle das bactérias intracelulares (SZABA *et al.* 2014). Pujol & Bliska (2005) constataram que a *Y. pestis* é incapaz de se replicar em macrófagos de camundongos ativados por IFN- γ .

Szaba *et al.* (2014) verificaram que camundongos cujas células T são incapazes de produzir IFN- γ e TNF- α não sobrevivem ao desafio pulmonar com *Y. pestis*. Em outro

estudo, Kummer *et al.* (2008) constataram que os anticorpos anti-F1 e anti-V protegem camundongos contra a peste pneumônica experimental, mas essa proteção é altamente dependente de IFN- γ e TNF- α . Os animais com capacidade de produzir e responder de forma eficiente às citocinas parecem ter maiores chances de combater a infecção em relação aqueles animais que não conseguem utilizá-las de forma eficiente.

Em todos os parâmetros analisados no experimento de detecção intracelular de citocinas foi possível observar claramente uma resposta diferenciada do grupo 1. Estes resultados podem ser um indício de estímulo das células T CD8 por epítopos imunodominantes de *Y. pestis*. Para a confirmação desta hipótese, são necessários estudos adicionais que possibilitem identificar as proteínas contidas no extrato total de *Y. pestis* e a contribuição de cada uma delas para a indução de resposta imune celular.

Dificuldade encontrada

É importante reforçar que os estudos acerca da resposta imune celular contra à *Y. pestis* ainda são limitados na literatura e por isso foram encontradas dificuldades para a comparação dos resultados obtidos.

6.1 Perspectivas futuras

- Pesquisar novos antígenos de *Y. pestis* com potencial para a indução de resposta imune celular e que possam ser incorporados futuramente em uma vacina de subunidade para peste, juntamente com a proteína F1.
- Avaliar a eficácia do esquema de imunização adotado neste estudo frente a outras doses e vias de administração.
- Investigar novos sistemas de adjuvantes capazes de gerar uma resposta imune baseada nos perfis Th1 e Th2 para uso em vacinas para peste.
- Avaliar a resposta imune induzida por cepas mutantes de *Y. pestis*, portadoras das deleções dos plasmídeos de virulência pYV⁻ e pFra⁻, tendo em vista o desenvolvimento de vacina atenuada para a peste.

7 CONCLUSÕES

- O esquema de imunização baseado na proteína F1 induz forte resposta imune humoral.
- O extrato total de *Y. pestis* nas doses de 40 µg e 20 µg não gera a produção de anticorpos anti-F1 em camundongos.
- A imunização com extrato total e antígeno F1 de *Y. pestis* não favorece a proliferação de células T CD4 ou T CD8.
- O extrato total de *Y. pestis* estudado não privilegia a expressão de IFN- γ e IL-10 em linfócitos T CD4.
- O extrato total de *Y. pestis* estudado favorece a produção de IFN- γ pela célula T CD8.
- A proteína F1 de *Y. pestis* não é um antígeno imunogênico para célula T.

REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M.; ZURTH, K.; MORELLI, G. *et al.* *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, p.14043–14048, 1999.

Disponível em: <http://www.pnas.org/content/96/24/14043.full.pdf>

Acesso em: 24/07/2014

ALMEIDA, A.M.P.; BRASIL, D.P.; MELO, M.E.B. *et al.* Importância dos carnívoros domésticos (cães e gatos) na epidemiologia da peste nos focos do Nordeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 4, p.49-55, 1988.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v4n1/04.pdf>

Acesso em: 28/07/2015

ALMEIDA, A.M.P.; SOUZA, G.T.; SANTOS, S. *et al.* Contribuição para o diagnóstico de peste. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p.53-55, 2007.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v40n1/a10v40n1.pdf>

Acesso em: 28/07/2015

ALMEIDA, A.M.P.; TAVARES, C. Peste. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia 1**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2015. p. 1315-1329.

AMADEI, A.; NICCOLAI, E.; MARINO, L. *et al.* Role of immune response in *Yersinia pestis* infection. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 9, p.628-639, 2011.

ANDERSON, G.W. Jr.; WORSHAM, P.L.; BOLT, C. R. *et al.* Protection of mice from fatal bubonic and pneumonic plague by passive immunization with monoclonal antibodies against the F1 protein of *Yersinia pestis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 4, p.471-473, 1997.

ARAGÃO, A.I.; PINHEIRO, K.M.A.; SEOANE, A.C.M. *et al.* Prevalência de anticorpos contra *Yersinia pestis* em carnívoros domésticos nos focos pestosos do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p.711-715, 2009.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v42n6/19.pdf>

Acesso: 28/07/2015

ARAUJO, F. T. M. **Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ – Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ**. 2012. 157f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ, Belo Horizonte, 2012.

Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4280>

Acesso em: 22/07/2015

BAKER, E.E.; SOMMER, H.; FOSTER, L.E. *et al.* Studies on immunization against plague. 1. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. **Journal of Immunology**, v. 68, n. 2, p.131-140, 1952.

BALTAZARD, M.; DAVIS, D.H.S.; DEVIGNAT, R. *et al.* Recommended laboratory methods for the diagnosis of plague. **Bulletin Organization World Health Organization**, v. 14, p.457-509, 1956.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2538045/pdf/bullwho00537-0107.pdf>
Acesso em: 25/03/2015

BANNERMAN, W. B. The Plague Research Laboratory of the Government of India, Parel, Bombay. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, v. 24, p.113-144, 1902.

BASHAW, J.; NORRIS, S.; WEEKS, S. *et al.* Development of *in vitro* correlate assays of immunity to infection with *Yersinia pestis*. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p.605-616, 2007.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865625/pdf/0398-06.pdf>
Acesso em: 23/05/2015

BRATTON, D.L.; HENSON, P.M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. **Trends Immunology**, v.32, n. 8, p.350–357, 2011.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151332/>
Acesso em: 25/03/2014

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Peste**, 1.ed., Brasília, 2008, 95p.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diretrizes da prática da eutanásia do CONCEA**, Brasília, 2013, 54 p.

BURROWS, W.; BACON, G.A. The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 37, n. 5, p.481-493, 1956.

BYVALOV, A.A.; OVODOV, I. Immunobiological properties of *Yersinia pestis* antigens. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 37, n. 4, p.452-463, 2011.

CARNIEL E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. **Microbes and infection**, v. 3, n. 7, p.561-569, 2001.

CAVANAUGH, D.C.; FORTIER, M.K.; ROBINSON, D.M. *et al.* Application of the ELISA technique to problems in the serologic diagnosis of plague. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 13, p.399-402, 1979.

CHANTEAU, S.; RAHALISON, L.; RALAFIARISOA, A. *et al.* Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. **Lancet**, v. 361, n. 361, p. 211-216, 2003.

CHASE, C.J.; ULRICH, M.P.; WASIELOSKI, L.P. Jr *et al.* Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis*. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 10, p.1778-1785, 2005.

CHIA, R.; ACHILLI, F.; FESTING, M.F.W. *et al.* The origins and uses of mouse outbred stocks. **Nature Genetics**, v. 37, n. 11, p.1181-1186, 2005.

CHU, M. Centers for Disease Control and Prevention. World Health Organization. **Laboratory Manual of Plague Diagnostic Tests**, 2000, 125p.

CORNELIS, R. G. Molecular and cell biology aspects of plague. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p.8778-8783, 2002.

Disponível em: <http://www.pnas.org/content/97/16/8778.full.pdf>

Acesso em: 06/05/2015

COULANGES, P. Cinquantenaire du vaccine antipesteux EV (Girard et Robic). **Bulletin de la société de pathologie exotique et de ses filiales**, v. 76, n. 2, p.114-120, 1983.

DENG, W.; BURLAND, V.; PLUNKETT, G. *et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p.4601-4611, 2002.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC135232/pdf/0056.pdf>

Acesso em: 06/05/2015

DINC, G.; PENNINGTON, J.M.; YOLCU, E.S. *et al.* Improving the Th1 cellular efficacy of the lead *Yersinia pestis* rF1-V subunit vaccine using SA-4-1BBL as a novel adjuvant. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p.5035-5040, 2014.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED), Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas. **Planilhas**. Belo Horizonte, 2014. Base de Dados em Microsoft Excel, versão 2010.

GAGE, L. K. (1999). Plague Surveillance. In: DENNIS, D. T. & GAGE, K. L., **Organização Mundial de Saúde. Plague Manual: Epidemiology, distribution, surveillance and control**, (pp. 136-165). Geneva.

GALIMAND, M.; GUIYOULE, A.; GERBAUD, G. *et al.* Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by transferable plasmid. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 10, p.677-681, 1997.

Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199709043371004>

Acesso em: 11/05/2015

GAO, H.; ZHOU, D.; LI, Y. *et al.* The Iron-Responsive Fur Regulon in *Yersinia pestis*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p.3063-3075, 2008.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2293247/pdf/1910-07.pdf>

Acesso em: 25/01/2015

GALYOV, E.E.; SMIRNOV, O.Y.; KARLISHEV, A.V. *et al.* Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. **FEBS Letters**, v. 277, p.230-232, 1990.

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001457939080852A>

Acesso em: 06/05/2015

GUPTA, G.; ALI, R.; KHAN, A.A. *et al.* Evaluation of CD4⁺/CD8⁺ T-cell expression and IFN- γ , perforin secretion for B–T constructs of F1 and V antigens of *Yersinia pestis*. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 1, p.64-73, 2012.

HILL, J.; EYLES, J.E.; ELVIN, S.J. *et al.* Administration of antibody to the lung protects mice against pneumonic plague. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p.3068-3070, 2006.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1459704/pdf/0175-06.pdf>

Acesso em: 31/07/2015

HINNEBUSH, B.J.; PERRY, R.D.; SCHWAN, T.G. Role of *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas. **Science**, v. 273, p.367 - 370, 1996.

HINNEBUSH, B.J.; RUDOLPH, A.E.; CHEREPANOV, P. *et al.* Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. **Science**, v. 296, n. 5568, p.733-735, 2002.

KARLYSHEV, A.V.; GALYOV, E.E.; SMIRNOV, O.Y. *et al.* A new gene of the *f1* operon of *Yersinia pestis* involved in the capsule biogenesis. **FEBS Letters**, v. 297, n. 1-2, p.77-80, 1992.

KNIREL, Y.A.; ANISIMOV, A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of Plague: Structure, Genetics, Biological Properties, **Acta Naturae**, v. 4, n. 3, p.46-58, 2012.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3492934/pdf/AN20758251-04-046.pdf>

Acesso em: 31/12/2013

KOBAYASHI, S.D.; BRAUGHTON, K.R.; WHITNEY, A.R. *et al.* Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p.10948–10953, 2003.

Disponível em: <http://www.pnas.org/content/100/19/10948.full.pdf>

Acesso: 23/04/2015

KUMMER, L.W.; SZABA, F.M.; PARENT, M.A. *et al.* Antibodies and cytokines independently protect against pneumonic plague. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p.6901-6907, 2008.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631396/pdf/nihms83972.pdf>

Acesso em: 30/05/2015

LADICS, G.S.; SMITH, C.; ELLIOT, G.S. *et al.* Further evaluation of the incorporation of an immunotoxicological functional assay for assessing humoral immunity for hazard identification purposes in rats in a standard toxicology study. **Toxicology**, v. 126, n. 2, p.137- 52, 1998.

LEVY, Y.; FLASHNER, Y.; TIDHAR, A. *et al.* T cells play an essential role in anti-F1 mediated rapid protection against bubonic plague. **Vaccine**, v. 29, n. 40, p.6866- 6873, 2011.

LI, B.; YANG, R. Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p.1804–1811, 2008.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2346703/pdf/1517-07.pdf>

Acesso em: 06/05/2015

LI, B.; ZHOU, L.; GUO, J.Y. *et al.* High-Throughput Identification of New Protective Antigens from a *Yersinia pestis* Live Vaccine by Enzyme-Linked Immunospot Assay. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p.4356–4361, 2009.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2747933/pdf/0242-09.pdf>

Acesso em: 23/07/2015

LIU, F.; CHEN, H.; GALVAN E.M *et al.* Effects of Psa and F1 on the adhesive and invasive interactions of *Yersinia pestis* with human respiratory tract epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5636–44, 2006.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1594889/>

Acesso em: 27/10/2015

LOIEZ, C.; HERWEGH, S.; WALLET, F. *et al.* Detection of *Yersinia pestis* in sputum by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p.4873-4875, 2003.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC254301/pdf/0169.pdf>

Acesso em: 11/11/2015

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p.265-75, 1951.

Disponível em: <http://www.jbc.org/content/193/1/265.long>

Acesso em: 23/09/2014

MERHEJ, V.; ADÉKAMBI, T.; PAGNIER, I. *et al.* *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 779-784, 2008.

Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.65219-0>

Acesso em: 07/11/2015

MEYER, K. F. Effectiveness of live or killed plague vaccines in man. **Bulletin World Health Organization**, v. 42, n. 5, p.653-666, 1970.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2427500/pdf/bullwho00216-0004.pdf>

Acesso em: 23/07/2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica nº 001 CDTV/CGDT/DEVEPSVS/MS. Dispõe sobre a reorientação estratégica das atividades de captura, coleta e exame de amostras de reservatórios, vetores e animais-sentinela, como parte da vigilância do Programa de Controle da Peste, 2007.

MOLLARET, H. H. Le cas de la peste. **Annales de démographie historique**, p. 101-110, 1989.

MONTMINY, S.W.; KHAN, N.; MCGRATH, S. *et al.* Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. **Nature Immunology**, v. 7, n. 10, p.1066-1073, 2006.

MURROS-KONTIAINEN, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; KORKEALA, P.J. *et al.* *Yersinia nurmii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2368-2372, 2011.

Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.024836-0>

Acesso em: 07/11/2015

MURROS-KONTIAINEN, A.; JOHANSSON, P.; NISKANEN, T. *et al.* *Yersinia pekkanenii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 2363-2367, 2011.

Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.019984-0>

Acesso em: 07/11/2015

NAKAJIMA, R.; BRUBABER, R. R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 1. p. 23–31, 1993.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC302683/pdf/iai00013-0045.pdf>

Acesso em: 07/11/2015

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Institute of Laboratory Animal Resources. **Guide for the care and use of laboratory animals**, 8.ed, Washington, 2008, 246p.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Review**, v. 219, n. 1, p.88–102, 2007.

Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x/pdf>

Acesso em: 24/07/2014

NAVARRO, L.; ALTO, N.M.; DIXON, J.E. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 1, p-21-27, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Plague in the Americas** (Scientific Publication), v. 115, 1965.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Plague. Fact sheet n. 267**, 2014.

Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/>

Acesso em: 02/11/2015

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Plague-Madagascar. **Disease outbreak news**, 2015.

Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/06-september-2015-plague/en/>

Acesso em: 02/11/2015

PARENT, M.A.; BERGGREN, K.N.; KUMMER, L.W. *et al.* Cell-Mediated Protection against Pulmonary *Yersinia pestis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p.7304–7310, 2005.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1273885/pdf/0832-05.pdf>

Acesso em: 24/07/2014

PARKHILL, J.; WREN, B.W.; THOMPSON, N.R. *et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. **Nature**, v. 413, n. 6855, p.523-527, 2001.

Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v413/n6855/pdf/413523a0.pdf>

Acesso em: 04/05/2015

PERRY, R.; FETHERSTON, J.D. *Yersinia pestis* - Etiologic agent of plague. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p.35-66, 1997.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172914/pdf/100035.pdf>

Acesso em: 23/05/2014

PERU. Ministerio de Salud. La peste, un reto para la Salud Publica del pais. **Boletín Epidemiológico (Lima)**, v. 22, n. 5, 2013.

Disponível em: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2013/05.pdf>

Acesso em: 10/06/2015

POLLITZER, R. (1954). History and present distribution of plague. **Plague. W.H.O.Monograph Series**, n. 22, (p.11-45). Geneva.

http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO_MONO_22.pdf Acesso em: 06/05/2015

PRADEL, E.; LEMAITRE, M.; MERCHEZ, M. *et al.* New Insights into How *Yersinia pestis* Adapts to Its Mammalian Host during Bubonic Plague, **Plos Pathogen**, v. 10, n. 3, p.1-14, 2014.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3968184/>

Acesso em: 18/03/2015

PUJOL, C.; BLISKA, J.B. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. **Clinical Immunology**, v. 114, n. 3, p.216-226, 2005.

QI, Z.; ZHOUB, L.; ZHANG, Q. *et al.* Comparison of mouse, guinea pig and rabbit models for evaluation of plague subunit vaccine F1 + rV270. **Vaccine**, v. 28, n. 6, p.1655-1660, 2010.

QUENEE, L.E.; SCHNEEWIND, O. Plague vaccines and the molecular basis of immunity against *Yersinia pestis*. **Human Vaccines**, v. 5, n. 12, p.817-823, 2009.

RADNEDGE, L.; AGRON, P.G.; WORSHAM, P.L. *et al.* Genome plasticity in *Yersinia pestis*. **Microbiology**, v. 148, p.1687-1698, 2002.

REBEIL, R.; ERNST, R.K.; JARRETT, C.O. *et al.* Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 4, p.1381-1388, 2006.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1367257/pdf/1572-05.pdf>

Acesso em: 05/05/2015

RUSSELL, P.; ELEY, S.M.; HIBBS, S. E. *et al.* A comparison of plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. **Vaccine**, v. 13, n. 16, p.1551-1556, 1995.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3 ed. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010, 264p.

SCHNEIDER, M.C.; NAJERA, P.; ALDIGHERI, S. *et al.* Where does human plague still persist in Latin America? **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 2, 2014.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916238/pdf/pntd.0002680.pdf>

Acesso em: 08/05/2015

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; HEESEMANN, J. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p.83-94, 2004.

SEBBANE, F.; JARRETT, C.; GARDNER, D. *et al.* The *Yersinia pestis* *caf1M1A1* fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p.1222-1229, 2009.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643634/pdf/0950-08.pdf>

Acesso em: 26/03/2015

SHANNON, J.G.; HASENKRUG, A.M.; DORWARD, D.W. *et al.* *Yersinia pestis* Subverts the Dermal Neutrophil Response in a Mouse Model of Bubonic Plague, **mbio**, v. 4, n. 5, p.1-10, 2013.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760243/>

Acesso em: 26/03/2015

SIMOND, P. L. (1898) La propagation de la peste. **Anais do Instituto Pasteur**, v. 12, p.625-687, Paris.

SIMPSON, W.J.; THOMAS, R.E.; SCHWAN, T.G. Recombinant capsular antigen (fraction 1) from *Yersinia pestis* induces a protective antibody response in BALB/c mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 4, p.389-396, 1990.

SKRZYPEK, E.; STRALEY, S.C. Differential effects of deletions in *IcrV* on secretion of V-antigen, regulation of the low- Ca^{++} response and virulence of *Yersinia pestis*. **Journal of Bacteriology**, v. 17, p. 2530-2542, 1995.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC176914/>

Acesso em: 27/10/2015

SODEINDE, O.A.; GOGUEN, J.D. Genetic analysis of 9,5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 10, p.1517-1523,1988.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC259638/pdf/iai00082-0223.pdf>

Acesso em: 06/05/2015

SONG, Y.; TONG, Z.; WANG, J. *et al.* Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. **DNA research**, v. 11, n. 3, p.179-197, 2004.

Disponível em: <http://dnaresearch.oxfordjournals.org/content/11/3/179.long>

Acesso em: 06/05/2015

SPINNER, J.I.; WINFREE, S.; STARR, T. *et al.* *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 3, p.389-398, 2014.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3923079/>

Acesso em: 23/07/2014

SPRAGUE, L.D; NEUBAUER, H. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, v. 55, p. 831–835, 2005.

Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.63220-0>

Acesso em: 07/11/2015

SPRAGUE, L.D.; SCHOLZ, H. C.; AMANN, S. *et al.* *Yersinia similis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 952-958, 2008.

Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.65417-0>

Acesso em: 07/11/2015

SULAKVELIDZE, A. *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 5, p. 497-513, 2000.

SUN, Y.; JARRETT, C.O.; BOSIO, C.F. *et al.* Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis*. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 5, p.578-586, 2014.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4084870/pdf/nihms586763.pdf>

Acesso: 23/07/2014

SZABA, F.M.; KUMMER, L.W.; DUSO, D.K. *et al.* TNF- α and IFN- γ but not perforin are critical for CD8 T cell-mediated protection against pulmonary *Yersinia pestis* infection. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 5, p.1-12, 2014.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2747933/pdf/0242-09.pdf>

Acesso em: 30/06/2015

TITBALL, R.W.; WILLIAMSON, D.E. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. **Vaccine**, v. 19, n. 30, p.4175-4184, 2001.

VAN, E.A.V.; AIT-OUFELLA, H.; TEDGUI, A. *et al.* Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology**, v. 32, p.887-893, 2012.

Disponível em: <http://atvb.ahajournals.org/content/32/4/887.full.pdf+html>

Acesso em: 23/05/2015

WILLEBERG, P.W.; RUPPANNER, R.; BEHYMER, D.E. *et al.* Epidemiologic survey of sylvatic plague by serotesting coyotes sentinels with enzyme immunoassay. **American Journal of Epidemiology**, v.110, n. 3, p.328-334.1979.

WILLIAMS, J.E.; ARNTZEN, L.; ROBINSON, D.M. *et al.* Comparison of passive haemagglutination and enzyme immunosorbent assay for serodiagnosis of plague. **Bulletin of World Health Organization**, v. 60, n. 5, p. 777-781, 1982.

WILLIAMS, J.E.; ARNTZEN, L.; TYNDAL, G.L. *et al.* Application of enzyme immunoassays for the confirmation of clinically suspect plague in Namibia, 1982. **Bulletin of World Health Organization**, v. 64, n. 5, p. 745-752, 1986.

WILLIAMSON E.D.; ELEY, S.M.; STAGG, A.J. *et al.* A sub-unit vaccine elicits IgG in serum, spleen cell cultures and bronchial washings and protects immunized animals against pneumonic plague. **Vaccine**, v. 15, n. 10, p.1079-1084, 1997.

WILLIAMSON, E.D; FLICK-SMITH H.C.; LEBUTT, C. *et al.* Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p.3598-3608, 2005.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1111881/pdf/2143-04.pdf>
Acesso em: 31/07/2015

WILLIAMSON, E.D.; OYSTON, P.C.F. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 172, p.1-8, 2012.
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719925/pdf/cei0172-0001.pdf>
Acesso em: 27/04/2015

ANEXO A- Certificado de aprovação do protocolo 148/2014 junto ao CETEA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 148 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação da resposta imune humoral e celular em animais imunizados com antígenos de *Y. pestis*", que tem como responsável Tania Mara Pinto Dabés Guimaraes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 03/03/2015. Este certificado espira-se em 03/03/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 148 / 2014, related to the Project entitled "Evaluation of humoral and cellular immune response in animals immunized with antigens of *Y. pestis*", under the supervision of Tania Mara Pinto Dabés Guimaraes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 03/03/2015. This certificate expires in 03/03/2020.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 03/03/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br