

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**



RACHID AREF EL-AOUAR FILHO

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO PERFIL FENOTÍPICO DE CULTURA PRIMÁRIA DE
MACRÓFAGOS FRENTE À INFECÇÃO PELA LINHAGEM SELVAGEM T1 E
SEU MUTANTE LINHAGEM CP13 DE *Corynebacterium pseudotuberculosis***

BELO HORIZONTE

NOVEMBRO – 2012

RACHID AREF EL AOUAR FILHO

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO PERFIL FENOTÍPICO DE CULTURA PRIMÁRIA DE
MACRÓFAGOS FRENTE À INFECÇÃO PELA LINHAGEM SELVAGEM T1 E
SEU MUTANTE LINHAGEM CP13 DE *Corynebacterium pseudotuberculosis***

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Genética, nível mestrado da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Genética.**

**Área de Concentração: Genética Molecular e de
Microorganismos**

Orientador: Prof. Dr. Vasco Azevedo

Coorientador: Dr. Alfonso Gala García

BELO HORIZONTE

NOVEMBRO – 2012

043

El-Aouar Filho, Rachid Aref.

Avaliação in vitro do perfil fenotípico de cultura primária de macrófagos frente à infecção pela linhagem selvagem T1 e seu mutante linhagem CP13 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* [manuscrito] / Rachid Aref El-Aouar Filho. – 2012.

89 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Vasco Azevedo. Co-orientador: Alfonso Gala Garcia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* – Teses. 2. Macrófagos – Teses. 3. Arginase. 4. Óxido nítrico – Teses. 5. Espécies reativas de oxigênio. 6. PCR quantitativo. 7. Citocinas – Teses. 8. Genética – Teses. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Gala-Garcia, Alfonso. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



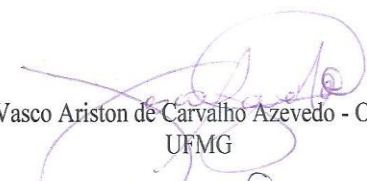
Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



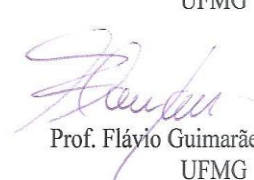
**"AVALIAÇÃO *in vitro* DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE CULTURA
PRIMÁRIA DE MACRÓFAGOS FRENTE À INFECÇÃO PELA
LINHAGEM SELVAGEM T1 E SEU MUTANTE CP13 DE
Corynebacterium pseudotuberculosis"**

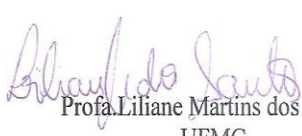
Rachid Aref El Aouar Filho

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador
UFMG


Dr. Alfonso Gala García - Co-orientador
UFMG


Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
UFMG


Profa. Liliane Martins dos Santos
UFMG

Belo Horizonte, 08 de novembro de 2012.

Resumo

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva pertencente à Classe das Actinobactérias. Esta bactéria é um patógeno intracelular facultativo causadora da patologia Linfadenite Caseosa (LC) em ovinos e caprinos. Durante o processo de infecção estas bactérias são contidas por células da resposta imune inata, sendo as principais células efetoras dessa defesa os neutrófilos e macrófagos. Este trabalho foi proposto com o intuito de avaliar a resposta de macrófagos murinos derivados de monócitos de medula, *in vitro*, em infecção por *C. pseudotuberculosis* linhagem CP13, um mutante para um gene relacionado ao transporte de ferro em *Corynebacterium diphtheriae*, que gerou bons níveis de proteção em subsequentes desafios contra *C. pseudotuberculosis*, e observar o perfil de resposta gerado por essas culturas. Este tipo de caracterização possibilita inferir a participação da resposta imune inata na ação contra infecções desta bactéria. Com os resultados obtidos neste trabalho, conseguimos observar que esta bactéria é responsável por diminuir a viabilidade das culturas de macrófagos em uma proporção que depende da concentração de bactérias inoculadas nas culturas de células. A infecção, em macrófagos, por *C. pseudotuberculosis*, foi responsável por ativar a produção de óxido nítrico (NO) e induzir a atividade da enzima arginase I, além de mostrar que este aumento da produção de NO e atividade da enzima arginase I estão relacionados ao aumento da expressão do RNAm para a enzima *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) e arginase I. Nossos resultados mostram, também, que a linhagem CP13 não induz a produção de ROS e que comparada com a linhagem T1, linhagem selvagem do qual foi derivada a linhagem CP13, induz maior produção da citocina IL-10 e menos TNF- α , em macrófagos. Com estes dados, pudemos inferir que a linhagem CP13 apresenta um perfil similar de ativação dos macrófagos, quando comparados com a linhagem T1. Entretanto houve diferença no perfil de citocinas induzidas por infecção em macrófagos pelas linhagens T1 e CP13, onde está última induziu mais IL-10 (citocina associada a um perfil de maior susceptibilidade a infecções microbianas).

Abstract

Corynebacterium pseudotuberculosis is a Gram-positive bacterium that belongs to the class Actinobacteria. This bacterium is a facultative intracellular pathogen that causes the disease caseous lymphadenitis (CL) in sheep and goats. During the process of infection by these bacteria are contained cells of the innate immune response, among which the main effectors defensives cells are neutrophils and macrophages. This work has been proposed with the aim of assessing the response of murine bone marrow monocyte-derived macrophages in *in vitro* infection with the CP13 strain of *C. pseudotuberculosis* - a knockout mutant for a gene related to the transportation of iron in *Corynebacterium diphtheriae* that generated good levels of protection against subsequent infections *C. pseudotuberculosis* - and observe the response profile generated by these cultures. This type of characterization allows the inference of the involvement of innate immune response against infections caused by this bacterium. So far, it was observed that this bacterium is responsible for diminishing the viability of the macrophage cultures in a ratio which depends on the concentration of bacteria inoculated in the cell cultures. The infection of macrophages by *C. pseudotuberculosis* was responsible for triggering the production of nitric oxide (NO) and inducing the activity of the enzyme arginase I. Also, it showed that the increase in the production of NO and in the activity of the enzyme arginase I are associated with increased expression of the enzyme Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and arginase I mRNA. The results also show that strain CP13 does not induce the production of ROS and, compared to the strain T1 - wild-type strain from which the CP13 strain was derived; it induces increased production of the cytokine IL-10 and decreased production of TNF- α in macrophages. With these data, it could be inferred that the strain CP13 has a similar profile of activation of macrophages compared to the strain T1. However, there was no difference in the profile of cytokines induced in macrophages by infection by strains T1 and CP13, in which the latter induced more IL-10 (cytokine profile associated with an increased susceptibility to microbial infection).

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais pela excelente formação acadêmica que me foi oferecida;

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES;

Ao meu orientador prof. Dr. Vasco Azevedo por me dar a oportunidade de trabalhar sob sua orientação.

Ao meu coorientador Dr. Alfonso Gala Garcia pela paciência e disponibilidade em me ajudar.

À prof(a). Dr(a). Leda Quercia pela parceria fornecida pelo LAGI ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Matheus Heitor, membro do LAGI, por me auxiliar e me orientar pelos campos tortuosos da imunologia.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem este trabalho;

Aos membros do LGCM por contribuírem de forma significativa ao meu desenvolvimento científico.

À amiga Izinara pela atenção e ajuda na correção desta dissertação.

À minha família e aos meus amigos que me deram base e apoio para seguir até o final.

À Deus.

Lista de Abreviaturas

BHI - Brain Heart Infusion

cDNA – DNA complementar

CIM - Concentração Mínima Inibitória

CMNR - *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EBDA - Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

G+C – Guanina + Citosina

GEPOC - Grupo de Extensão da Pesquisa em Ovinos e Caprinos

GM-CSF - Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

Hsp – Heart-Shock Proteins

IFN- γ - Inteferon gama

IgG - Imunoglobulina G

IL-4 – Interleucina 4

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

iNOS - Inducible Nitric Oxide Synthase

LC - Linfadenite Caseosa

LGCM - Laboratório de Genética Celular e Molecular

M1 – Macrófagos Ativados de Forma Clássica

M2 – Macrófagos Ativados de Forma Alternativa

meso-DAP - Ácido meso-diaminopimélico

mPCR – PCR multiplex

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolium

MØ – Macrófago

MØ+1002 – Macrófago coinfectado com linhagem 1002

MØ+CP13 – Macrófago coinfectado com linhagem CP13

MØ+CP13+ IFN- α - Macrófago suplementado com IFN- α coinfectado com linhagem CP13

MØ+IL-4 – Macrófago suplementado com IL-4

MØ+T1 – Macrófago coinfectado com linhagem T1

MØ+T1+ IFN- α - Macrófago suplementado com IFN- α coinfectado com linhagem T1

MØ+Zymosan – Macrófago incubado com Zymosan

NK – natural killer cell

nm – Nanômetro

NO – Óxido Nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

PBMCs - células mononucleares do sangue periférico

phoZ – Fosfatase Alcalina

PLD – Fosfolipase D

RFLP - Análise do Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição

RNA – Acido ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

qPCR – PCR em tempo real

rpoB - subunidade beta da RNA polimerase

RNAP - RNA polimerase

Th1 – T Helper 1 cell

Th2 – T helper 2 cell

TGF- β - Transforming Growth Factor-beta

TLR - Toll-like receptors

TNF- α – Tumor necrosis factor-alpha

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

μ M - Micromolar

μ L – Microlitro

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Grupos usados no teste de dosagem indireta da produção de óxido nítrico	41
Tabela 2 – Grupos usados no teste de mensuração da atividade da enzima arginase I	42
Tabela 3 – Grupos usados na dosagem da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	42
Tabela 4 – Combinações de iniciadores utilizados no ensaio de qPCR	45
Tabela 5 – Reagentes e suas quantidades utilizadas nas reações de qPCR	46
Tabela 6 – Parâmetros selecionados no termociclador para o processamento das reações de RT-qPCR	46
Tabela 7 – Grupos usados para análise da expressão gênica por qPCR	47

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição representativa de cores para perfis de ativação de macrófagos	29
Figura 2 – Viabilidade Celular (MOI 1:1)	49
Figura 3 – Viabilidade Celular (MOI 1:5)	50
Figura 4 – Mensuração da produção de NO (MOI 1:1)	51
Figura 5 – Mensuração da produção de NO (MOI 1:5)	52
Figura 6 – Mensuração da produção de NO (MOI 1:1 x 1:5)	53
Figura 7 – Mensuração da atividade da enzima Arginase I (MOI 1:1)	54
Figura 8 – Mensuração da atividade da enzima Arginase I (MOI 1:5)	55
Figura 9 – Mensuração da atividade da enzima Arginase I (MOI 1:1 x 1:5)	56
Figura 10 – Dosagem da produção de ROS	57
Figura 11 – Dosagem da produção da citocina IL-10	58
Figura 12 – Dosagem da produção da citocina TNF- α	59
Figura 13 – Dosagem da produção da citocina TGF- β	60
Figura 14 – Mensuração da expressão relativa do gene da enzima Inducible Oxide Nitric Synthase (iNOS) (MOI 1:5)	61
Figura 15 – Mensuração da expressão relativa do gene da enzima arginase I (MOI 1:5)	62
Figura 16 – Mensuração da expressão relativa do gene do transportador CAT2B, (MOI 1:5), para os mesmos grupos da mensuração da expressão relativa do gene da enzima arginase I	64
Figura 17 – Mensuração da expressão relativa do gene do transportador CAT2B, (MOI 1:5), para os mesmos grupos da mensuração da expressão relativa do gene da enzima iNOS	65

Sumário

1 – Introdução	13
1.1 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	14
1.1.1 - Aspectos microbiológicos e bioquímicos.....	14
1.1.2 - Taxonomia	15
1.1.3 - Suceptibilidade microbiana a antibióticos.....	15
1.1.4 - Determinantes de virulência	16
1.2 - Linfadenite caseosa (LC)	17
1.2.1 - Epidemiologia	17
1.2.2 - Transmissão	18
1.2.3 – Patogenia e manifestações clínicas	19
1.2.4 - Diagnóstico	20
1.2.5 - Tratamento e medidas profiláticas.....	21
1.2.6 - Vacinas.....	22
1.2.7 - Linhagem CP13	24
1.3 - Resposta Imune do hospedeiro frente à <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> ...	25
1.3.1 - Resposta Imune Inata	25
1.3.2 - Resposta imune adquirida	26
1.4 - Macrófagos.....	27
1.4.1 - Perfis de Ativação dos Macrófagos	28
1.5 - Justificativa	32
2 – Objetivos.....	35
2.1 - Objetivo Geral.....	36
2.2 - Objetivos Específicos	36
3 - Material e Métodos	37
3.1 - Linhagens bacterianas	38
3.2 - Cultivo bacteriano e contagem	38
3.3 - Obtenção de macrófagos de medula	38

3.4 – Infecções de macrófagos de medula com as linhagens T1 e CP13	39
3.5 - Avaliação do perfil fenotípico de macrófagos em cocultura com o mutante CP13 de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	39
3.5.1 - Padronização da Multiplicidade de Infecção (MOI) através da mensuração da viabilidade celular pelo teste MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolium):	39
3.5.2 - Mensuração da produção de óxido nítrico da cultura:	40
3.5.3 - Mensuração da atividade da enzima arginase I:	41
3.5.4 - Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	42
3.5.5 - Dosagem da produção das Citocinas IL-10, TNF- α e TGF- β	43
3.6 - Mensuração da expressão relativa dos genes das enzimas iNOS, arginase I e do transportador CAT2B.....	43
3.6.1 - Extração de RNA	43
3.6.2 - Síntese de cDNA	44
3.6.3 – PCR em tempo Real (qPCR).....	44
3.7 - Análises estatísticas.....	47
4 – Resultados	48
4.1 - Viabilidade Celular (MTT)	49
4.2 - Produção de óxido nítrico (NO).....	50
4.3 - Atividade da enzima arginase I.....	53
4.4 - Produção de Espécies Reativas de Oxigênios (ROS).....	56
4.5 - Dosagem das Citocinas IL-10, TNF- α e TGF- β	58
4.6 - qPCR.....	60
4.6.1 - Mensuração da expressão relativa do gene codificante da enzima Inducible Oxide Nitric Synthase (iNOS).....	60
4.6.2 - Mensuração da expressão relativa do gene da enzima arginase I	61
4.6.3 - Mensuração da expressão relativa do gene do transportador Cationic Amino Acid Transporter (CAT2B)	63
5 – Discussão	66

6 – Conclusão	74
7 - Perspectivas.....	76
8 – Referências	78

1 – Introdução

1.1 - *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva pertencente à Classe das Actinobactérias, composta por bactérias com alto conteúdo G+C em seu DNA cromossômico. Dentro desta classe destacamos o grupo CMNR, cujos representantes, os gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, possuem características em comum como organização da parede celular baseada num grande complexo polimérico de peptidoglicano, arabinogalactano e ácido micólico (Collins *et al.*, 1982; Bayan *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006).

1.1.1 - Aspectos microbiológicos e bioquímicos

C. pseudotuberculosis é um patógeno intracelular facultativo, apresentando formas pleomórficas entre cocóides e bastões filamentosos, medindo em torno 0,5 µm a 0,6 µm de largura por 1 µm a 3 µm de comprimento. Esta bactéria não esporula, é imóvel e possui fimbrias. Além disso, é aeróbica facultativa e possui um melhor crescimento em temperatura de 37 °C, em pH entre 7.0 e 7.2. Em ágar, o crescimento bacteriológico de *C. pseudotuberculosis* se dá, inicialmente, espaçado superficialmente e, posteriormente, se organiza em colônias opacas, de crescimento arredondado e de cor creme alaranjado; já em meio líquido, *C. pseudotuberculosis* cresce em forma de depósitos granulares como flocos (Dorella *et al.*, 2006).

Entre os constituintes do peptidoglicano da parede celular, temos o ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP), que está relacionado à resistência da parede contra uma grande variedade de peptidases. Completando parte da constituição desta parede celular, temos como principais açúcares a arabinose e galactose, além da presença do ácido micólico em cadeias curtas (Collins *et al.*, 1982; Dorella *et al.*, 2006). *C. pseudotuberculosis* apresenta variações entre suas reações bioquímicas, principalmente em relação a fermentação. As linhagens desta bactéria produzem ácido, ao invés de gás, a partir de fontes de carbono como glicose, frutose, manose, galactose e sacarose (Holt *et al.*, 1994). Estas bactérias são catalase, urease e fosfolipase D (PLD) positivas, oxidase negativa e beta hemolítica (Muckle & Gyles, 1982).

1.1.2 - Taxonomia

Inicialmente, *C. pseudotuberculosis* foi classificada através da sua morfologia e características bioquímicas. A propriedade de redução de nitrato foi usada para diferenciar biovar *equi* (isolados de equinos e bovinos, positivos para a redução), do biovar *ovis* (isolados de ovinos e caprinos, negativos para a redução) (Biberstein *et al.*, 1971). Posteriormente, Songer *et al.* (1988) usaram endonucleases de restrição (*EcoRV* e *PstI*) para classificar a *C. pseudotuberculosis* por análises do DNA cromossomal, chegando a mesma conclusão da classificação pela capacidade de reduzir nitrato (Songer *et al.*, 1988). Em outro tipo de análise, utilizando a tecnologia do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) para classificação do biovar de *C. pseudotuberculosis*, chegaram ao mesmo padrão de classificação da característica para redução do nitrato (Vaneechoutte *et al.*, 1995).

Estudos utilizando o gene da subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) mostrou-se mais eficiente para diferenciar espécies de *Corynebacterium* do que o gene do 16s *rRNA* (Khamis *et al.*, 2004), sendo que este tipo de análise já é usado para estudos filogenéticos em espécies do gênero *Mycobacterium*. Apesar da análise do gene *rpoB* ser uma forte ferramenta para análises filogenéticas, muitos autores propõem que o uso deste gene seja feito em complementaridade ao gene 16s *rRNA* (Khamis *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 1999).

1.1.3 - Suceptibilidade microbiana a antibióticos

C. pseudotuberculosis apresenta resposta diferenciada a agentes antimicrobianos e esta é dependente da origem de onde o isolado foi obtido. Os isolados de *C. pseudotuberculosis* de maior resistência aos agentes antimicrobianos tiveram origem de mastites de ovelhas (Fernández *et al.*, 2001). Estudos mostraram que 26 linhagens obtidas de lesões de linfadenite caseosa (LC), doença causada pela *C. pseudotuberculosis*, foram susceptíveis aos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina G e sulfametoxazol/trimetropim. Destas linhagens, três foram susceptíveis somente a neomicina e todas foram resistentes à estreptomicina. A concentração mínima inibitória (CIM) de antibiótico para estes

isolados foram similares. Entretanto, em relação à susceptibilidade, foi variável dependendo das condições infecciosas. Como comentado anteriormente, o maior CIM foi encontrado para isolados de mastites de ovelhas (Fernández *et al.*, 2001). Estudos mostraram que quando houve a formação de biofilmes, em *C. pseudotuberculosis*, esta se tornou resistente a todos os agentes antimicrobicidas testado por estes autores (Olson *et al.*, 2002).

1.1.4 - Determinantes de virulência

Pouco se conhece em relação às bases genéticas e moleculares da virulência em *C. pseudotuberculosis*. Atualmente, são bem caracterizados apenas dois fatores de virulência desta bactéria: os lipídeos tóxicos da parede celular e a exotoxina PLD (Dorella *et al.*, 2006).

A PLD, principal fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, é uma potente exotoxina com ação de esfingomielinase que promove a hidrólise das ligações éster na esfingomielina da membrana de células de mamíferos. A função de esfingomielinase facilita a dispersão da bactéria do sítio inicial de infecção para pontos secundários dentro do hospedeiro, devido à ação dermonecrótica da PLD, levando a danificação dos vasos endoteliais da derme e promovendo o extravasamento de plasma para os vasos linfáticos (McKean *et al.*, 2007a; Dorella *et al.*, 2006). Esta exotoxina age, também, como leucotóxica, levando a destruição de células como os macrófagos. O papel desta exotoxina na virulência da bactéria ficou evidente quando um mutante para este gene mostrou-se atenuado e com baixa capacidade de disseminação no hospedeiro, gerando ainda, mesmo que baixa e não totalmente satisfatória, uma resposta imunológica protetora contra *C. pseudotuberculosis*. (Hodgson *et al.*, 1992).

Os lipídeos da parede celular são importantes fatores de virulências para *C. pseudotuberculosis* e foram descritos por Hard *et al.* (1972) como participantes da patogênese desta bactéria. Uma característica das linhagens mais virulentas desta bactéria é apresentarem mais lipídeos quando comparado com as menos virulentas. A camada lipídica serve como proteção contra enzimas degradativas encontradas dentro dos fagolisossomos das células da defesa imunes inatas ativadas. Outra característica muito importante, atribuída por estes lipídeos da parede celular, é a capacidade de aumentar a adesão e induzir a atividade citotóxica local (Alves *et al.*, 1997). Esta

atividade citotóxica foi comprovada pela injeção de lipídeos extraídos das células bacterianas em cobaias, o que gerou necrose hemorrágica (Jolly, 1966).

1.2 - Linfadenite caseosa (LC)

C. pseudotuberculosis é o causador da patologia LC em ovinos e caprinos. Em outros hospedeiros, como camelídeos, suínos, bubalinos e equinos, esta bactéria é causadora da linfangite ulcerativa ou acne contagiosa. Já em humanos, a *C. pseudotuberculosis* é responsável por causar a linfadenite subaguda crônica (Williamson, 2001; Yeruham *et al.*, 2004). Estas doenças são crônicas, infecto-contagiosas e caracterizam-se por um quadro de abscessos dos linfonodos gerando material purulento branco-esverdeado (Ayers, 1977).

1.2.1 - Epidemiologia

A linfadenite caseosa é uma enfermidade mundialmente distribuída e atualmente é endêmica na Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá e Brasil, países que apresentam uma forte atividade de ovino e caprinocultura (Williamson, 2001; Arsenault *et al.*, 2003; Paton *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006). O Brasil detém 3% dos 900 milhões de caprinos e ovinos do rebanho mundial (EMBRAPA Semi-Árido, 2008). No Brasil, a *C. pseudotuberculosis* já foi isolada e caracterizada em vários estados, estimando que a prevalência clínica seja de 30%, sendo que a região nordeste é a mais acometida (Ribeiro *et al.*, 2001). Nesta região, de 656 caprinos analisados, viu-se que durante dois anos, 41% deles possuíam abscessos superficiais palpáveis (Unanian *et al.*, 1985). Um levantamento epidemiológico feito pelo Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) e com a colaboração do Grupo de Extensão da Pesquisa em Ovinos e Caprinos (GEPOC), que disponibilizou um banco de soros com informações referentes às amostras, mostrou que 78,9% dos caprinos (Seyffert *et al.*, 2009) e 75,8% dos ovinos (Guimarães *et al.*, 2009), são soro positivos para LC em Minas Gerais.

A LC, embora seja uma doença tipicamente veterinária, pode acometer aos humanos. Na literatura há registro da ocorrência de mais 25 casos, a maioria deles

devido ao contato direto de pessoas com animais infectados ou a materiais contaminados, mostrando o grande potencial zoonótico desta bactéria (Peel *et al.*, 1997). Por exemplo, Liu *et al.*, (2005) relatou uma infecção, por *C. pseudotuberculosis*, durante um implante ocular em um paciente.

Esta doença tem grande impacto mundial, uma vez que ela leva a perdas econômicas significativas relacionadas à lã, carne, leite e couro dos animais infectados (Dorella *et al.*, 2006). Na região do Semi-Árido, os caprinos são as principais fonte de alimentação e renda da população, o que torna a LC questão uma questão sócio econômica.

1.2.2 - Transmissão

A habilidade da *C. pseudotuberculosis* em sobreviver por várias semanas no ambiente é um dos fatores que aumenta a sua capacidade de se espalhar dentro do rebanho (Augustine *et al.*, 1986). A transmissão entre caprinos e ovinos dá-se, principalmente, através de feridas superficiais que podem surgir através de procedimentos rotineiros como tosquia, castração, marcação auricular e injúrias nos corpos ocasionados por algum evento traumático.

O uso de material contaminado como tesouras, canivetes e máquinas de tosquia também contribuem para a disseminação desta bactéria (Smith & Sherman, 1994). No caso de bubalinos e bovinos há casos em que moscas da ordem Diptera são responsáveis por um mecanismo natural de dispersão de *C. pseudotuberculosis* (Yeruham *et al.*, 1996). Outra grande fonte de contaminação de rebanhos ocorre quando abscessos supuram e estes podem conter quantidade suficiente de bactérias para contaminar todo o rebanho. O diagnóstico desta doença é fundamental para prevenção ou para manter um baixo nível de transmissão, sendo que devido ao fato desta bactéria poder se incubar no hospedeiro por até dois anos sem apresentar sintomas, o uso de um diagnóstico adequado poderia ajudar na detecção e isolamento dos animais infectados (Paton *et al.*, 1994), diminuindo as incidências de infecções nos rebanhos.

1.2.3 – Patogenia e manifestações clínicas

A principal via de infecção de *C. pseudotuberculosis* é através de feridas na pele. Quando esta bactéria invade o hospedeiro ela é fagocitada por células da resposta imune inata. Esta resposta inicial do hospedeiro à infecção acaba sendo ineficiente, uma vez que estas bactérias, devido à sua cobertura lipídica, são capazes de resistir ao compartimento fagolisossômico das células fagocíticas, e assim se multiplicam e induzem a lise celular infectando outras células. Com este ciclo de infecção das células fagocíticas e lise das mesmas, as bactérias acabam acometendo o linfonodo drenante mais próximo, gerando lesões necróticas (Jones *et al.*, 2000). Posteriormente, estas bactérias, com novos ciclos de replicação, colonizam o linfonodo e acabam acometendo vários outros órgãos. A disseminação desta bactéria é favorecida pela PLD que age como um fator de permeabilidade, facilitando a passagem da *C. pseudotuberculosis* pelos tecidos do hospedeiro (Airello *et al.*, 2001). O sistema imune, com o intuito de conter a disseminação desta bactéria, leva a formação de granulomas. O granuloma inicia-se pelo aparecimento de células epitelióides substituídas posteriormente por uma necrose caseosa (Jones *et al.*, 2000) que vai sendo rodeadas por células epiteliais, linfócitos e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso, respectivamente. Esse processo crônico se repete sucessivamente sobre a camada fibrosa, resultando no aspecto macroscópico desta patologia caracterizada por uma massa esférica laminada, como camadas de uma cebola (Jones *et al.*, 2000).

A LC é uma doença de desenvolvimento lento, sendo mais comum a forma externa, que se caracteriza pela formação de abscessos e nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos. Vários órgãos internos podem ser acometidos por estes abscessos, entre eles, os pulmões, rins, baço e fígado, caracterizando a LC visceral (Merchant & Packer, 1967). A localização dos granulomas depende, principalmente, da via de transmissão desta bactéria, que esta relacionada à forma de manejo do rebanho como, por exemplo, o procedimento usado durante as tosquias (Arsenault *et al.*, 2003). Nos caprinos, os abscessos são formados quase sempre na região da cabeça e quase nunca na porção posterior do corpo e nos ovinos a forma mais recorrente da LC é a visceral (Ayers, 1977). Uma característica desta doença é que ela pode ser assintomática, e isto dificulta a análise epidemiológica da LC (Paton *et al.*, 1994).

1.2.4 - Diagnóstico

Muitos testes diagnósticos foram desenvolvidos para *C. pseudotuberculosis*, sendo que a partir de 1940, até os dias atuais, uma grande quantidade de trabalhos foi publicada a respeito de métodos diagnósticos envolvendo testes sorológicos, bacteriológicos, bioquímicos e moleculares.

Em 1940, Carne desenvolveu um teste de soroneutralização em ovinos para antitoxinas nesses animais. Em paralelo, novas técnicas como a imunodifusão em gel, hemaglutinação indireta passiva e inibição da hemólise em tubo foram desenvolvidas (Shigidi, 1974; Shigidi, 1978; Burrell, 1980).

Nos anos 80, os primeiros testes de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) foram desenvolvidos para diagnóstico de LC (Shen *et al.*, 1982). A partir desta década, a técnica sofreu várias adaptações para melhorar a sua acurácia, como por exemplo, o ELISA indireto com PLD – ELISA com proteínas secretadas, preparações de células bacterianas e o ELISA para detectar IFN- γ como marcador de imunidade mediada por *C. pseudotuberculosis* (Dercksen *et al.*, 2000; Menzies *et al.*, 2004; Binns *et al.*, 2007).

O teste padrão ouro para diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* atual consiste na cultura bacteriológica seguida por identificação bioquímica de isolados. Estes testes bioquímicos podem ser realizados em laboratório ou feitos através da obtenção do teste comercial, denominado API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme lès Grottes, France), para identificação de bactérias coryneformes. Este, consiste em uma bateria de 21 reações bioquímicas, que são realizados entre 24 e 48 horas. O API Coryne possui testes para 11 enzimas diferentes e oito testes de fermentação de carboidratos.

Um método diagnóstico molecular com eficiência do padrão ouro foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (LGCM) (Pacheco *et al.*, 2007). Este ensaio, faz uso de uma reação de PCR multiplex (mPCR) para uma detecção mais rápida da *C. pseudotuberculosis*. Esta mPCR usa como alvos os genes *16s rDNA*, gene de constante uso taxonômico para bactérias para diferenciação em gênero, o *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), o qual vem sendo muito usado para classificação taxonômica e diferenciação entre gêneros, e o gene *pld* (fosfolipase D), responsável por codificar uma exotoxina associada a virulência em *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* e

Arcanobacterium haemolyticum, capaz de proporcionar uma identificação a nível de espécie. Este teste ainda possibilitou a análise diretamente de material purulento de animais infectados por *C. pseudotuberculosis*, o que tornou o diagnóstico rápido, sem a necessidade da cultura bacteriológica (Pacheco *et al.*, 2007). Entretanto, o uso deste teste para análises através da via sorológica não foi possível, o que ainda mantém este campo aberto para novas pesquisas.

1.2.5 - Tratamento e medidas profiláticas

O tratamento da LC normalmente é destinado a animais de alto valor zootécnico como matrizes reprodutivas, entretanto, este tratamento nem sempre é eficaz. Uma opção é o uso de terapia a base de antibióticos, porém a cápsula do abscesso impede a penetração destes fármacos no interior do mesmo, tornando o uso de antibióticos ineficientes contra a LC (Olson *et al.*, 2002). Outra opção é a drenagem e remoção dos linfonodos superficiais acometidos, entretanto não há garantia de eliminação completa das bactérias e esta técnica não é viável quando órgãos e linfonodos internos são acometidos. Um outro problema deste método é que o rompimento de um abscesso pode levar à contaminação ambiental com *C. pseudotuberculosis* e facilitar a disseminação desta pelo rebanho (Dorella *et al.*, 2006). Portanto, devido às falhas encontradas no tratamento da LC, a melhor forma de se controlar a doença é através de medidas profiláticas.

A LC deve ser controlada a partir da identificação de animais infectados e seu posterior isolamento, evitando que animais não contaminados e saudáveis sejam comprometidos (Dorella *et al.*, 2006). A higienização de todos os instrumentos e ambientes (galpões, troncos de tosquia e baias, tesouras, canivetes) de uso comum com produtos desinfetantes após a sua utilização deve ser tomada como medida profilática inicial (Alves *et al.*, 1997). Atividades, como tosquia, devem sempre começar dos animais mais jovens, passando para os mais velhos de forma subsequente, e evitando manipulação de animais que possuam abscessos palpáveis visíveis. Animais com feridas superficiais devem ser banhados com produtos veterinários de ação bactericida (Dorella *et al.*, 2006). Medidas como descarte de animais com lesões aparentes ou soropositivos para a LC devem ser tomadas com muita atenção, uma vez que, falsos positivos podem surgir e levar a perdas desnecessárias de animais (Menzies *et al.*, 2004).

Como observado, as medidas tomadas para tratamento e profilaxia apresentam grande números de vieses. Os tratamentos não garantem 100% de eliminação das bactérias e as medidas profiláticas podem levar a perda de animais, o que necessita de grande cuidado e atenção por parte dos criadores. Assim, o controle da LC deve basear-se em medidas que dificultem a entrada da *C. pseudotuberculosis* nos rebanhos, e para isto o desenvolvimento de vacinas com potencial efeito protetor se torna uma medida atrativa para o combate a LC.

1.2.6 - Vacinas

Considerando a dificuldade em tratar e evitar a contaminação dos rebanhos por *C. pseudotuberculosis*, a imunoprofilaxia se torna a melhor medida. Várias vacinas comerciais já estão disponíveis em alguns países. Normalmente, estas vacinas são baseadas em sobrenadantes de culturas de células inativadas, sendo que a PLD é o principal componente, combinados com outros patógenos como bactérias do gênero *Clostridium* (Stanford *et al.*, 1998). A vacina GlanvacTM, uma vacina combinada, foi distribuída em vários países e gerou proteção em ovinos e caprinos com subsequente desafio com *C. pseudotuberculosis*, caracterizado pela diminuição do número de formação de lesões. Outra vacina disponível, a Caseous D-TTM, o qual possui duas formulações (primeira, contendo toxóides clostridiais; e segundo, possuindo combinação da bactéria *C. pseudotuberculosis* e toxóide) também se encontra disponível. Em estudos prévios, o uso da Caseous D-TTM de dois componentes mostrou maior proteção contra *C. pseudotuberculosis*, em comparação com a de um componente, mostrando diminuição do número e tamanho dos abscessos nos pulmões e diminuindo a disseminação desta bactéria no rebanho (Piontkowski *et al.*, 1998). Uma vacina viva naturalmente atenuada, originada de uma cepa de *C. pseudotuberculosis*, linhagem 1002, foi disponibilizada no Brasil mostrando uma proteção de 83.3%. Entretanto, estes resultados obtidos em animais experimentais não foram repetidos no campo (Ribeiro *et al.*, 1991; Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA).

Todas as vacinas apresentadas acima mostraram problemas depois do uso. Em estudos realizados com fazendeiros australianos, os quais 43% fazem uso destas vacinas comerciais, mostrou que somente 12% deles fazem uso corretamente das vacinas (Paton *et al.*, 2003). Estas vacinas geralmente são dadas em duas ou mais doses

em cordeiro e ovinos adultos, e a revacinação é recomendada em intervalos de até seis meses. Isto faz com que exista um enorme erro metodológico durante a aplicação das vacinas, levando a uma mistura das mesmas, sendo necessária uma maior aplicação de doses e consequentemente um aumento do trabalho e custos da imunização dos animais. Assim, o desenvolvimento de novas vacinas que requerem uma única dose para gerar proteção contra *C. pseudotuberculosis* seria de grande valia para o uso veterinário. Além disso, nem todas as vacinas que geram proteção em ovinos são tão eficientes em caprinos. Assim, a urgência para o desenvolvimento de novas vacinas se torna necessário (Paton *et al.*, 2003).

Novas vacinas veem sendo pesquisadas com o intuito de gerar proteção forte e duradoura contra a LC sem gerar resultados falso-positivos e reações adversas em animais imunizados, junto com um baixo custo de produção. Diferentes estratégias têm sido testadas, incluindo vacinas atenuadas, bactérias mortas, frações de paredes celulares bacterianas, sobrenadante de culturas, células livres de toxóides e vacinas de DNA (Dorella *et al.*, 2009). Estas vacinas têm abrangido uma taxa de proteção entre 38% a 98%, entretanto, seus perfis de proteção ainda permanecem questionáveis, uma vez que efeitos secundários são observados, como formação de abscessos nos sítios de inoculação (Dorella *et al.*, 2009).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com o intuito de identificar alvos para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico contra a *C. pseudotuberculosis*. Em um trabalho anterior utilizou-se o transposon TnFuZ na mutagênese aleatória da linhagem selvagem T1 de *C. pseudotuberculosis*, linhagem esta selvagem e isolada de cabras no estado da Bahia. Neste trabalho foram identificados 34 mutantes de *C. pseudotuberculosis* (Dorella *et al.*, 2006b). O TnFuZ é derivado do elemento transponível Tn4001, que se transpõe eficientemente em bactérias gram-positivas (Lyon *et al.*, 1998; Hutchison *et al.*, 1999). Ele está fusionado ao gene da fosfatase alcalina (*phoZ*), isolado da bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis* cujo peptídeo sinal e o promotor foram removidos, ao gene de resistência à canamicina gerando assim o plasmídeo pCMG8 (Perez-Casal *et al.*, 1991; Gibson & Caparon, 2002). A proteína PhoZ só é ativa quando secretada, portanto, caso o gene que a codifica seja inserido em um locus codificador de uma proteína exportada, este mutante apresentará marcação fenotípica positiva devido a degradação do substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato por esta proteína quimérica (Gibson & Caparon, 2002).

Dois mutantes obtidos por esta técnica, CP09 e CP13, foram testados em ensaios de imunização em camundongos proporcionando 60% e 81% de proteção aos animais, respectivamente, após desafio com uma linhagem virulenta. A linhagem CP13, um mutante para um gene que codifica uma proteína ligada ao transporte de ferro, foi então considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de uma vacina atenuada contra a LC (Dorella, 2009). Além disso, foi mostrado que um mutante para um gene de um operon ligado ao transporte de ferro *C. pseudotuberculosis* mostrava menor virulência em infecções em caprinos, sugerindo que mutantes para esse gene diminuíam sua habilidade de sobreviver dentro do hospedeiro devido ao seu defeito em captar ferro. (Billington *et al.*, 2002).

1.2.7 - Linhagem CP13

A busca pela identificação do gene mutado na linhagem CP13 (*ciuA*) mostrou que ele apresentava similaridade com uma provável proteína ligante relacionada ao transporte de ferro em *Corynebacterium diphtheriae*. Em seguida, a busca por motivos conservados na provável proteína codificada por este gene, mostrou um sítio de ligação a ferro-enxofre (2Fe-2S ferredoxina), além de mostrar que esta provável proteína apresenta duas hélices transmembrânicas (Dorella, 2009).

Este mutante, em ensaios repetidos de imunização em um grupo de 10 camundongos, mostrou uma proteção maior que o encontrado em algumas vacinas já disponíveis no mercado, como a Glanvac® e a Biodectin®. Em teste de dosagem da produção de imunoglobulinas, este mutante induziu a produção de bons níveis de imunoglobulina G (IgG), tanto IgG1 e IgG2a. Entretanto, em testes para avaliar a produção de citocinas relacionadas à resposta imune inata não se obteve resultados que gerassem informações suficientes para inferir a participação desta via na defesa do hospedeiro. Nestes testes não foi possível dosar, com precisão, a produção de IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-4 (IL-4), obtendo somente bons títulos de leitura para a citocina interleucina 10 (IL-10) (Dorella, 2009).

Este mutante, possui como diferenças básicas entre o seu parental T1, a mutação para o gene *ciuA*, o primeiro gene do operon *ciuABCD*, o qual devido a

inserção do transposon levou a interrupção de todo o operon. Além disto, a linhagem CP13 possui os genes fosfatase alcalina e do marcador de resistência a canamicina.

1.3 - Resposta Imune do hospedeiro frente à *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Evidência da base celular para a imunidade contra *C. pseudotuberculosis* tem incluído a emergência da participação e ativação de macrófagos durante a infecção ou em reinfecções. Já a participação da resposta imune adquirida, seria mediada principalmente pela ativação de células T, que efetivamente garantem uma proteção contra *C. pseudotuberculosis*. O papel de linfócitos B, principalmente através da produção de anticorpos, não está relacionado à uma proteção eficiente (Muckle *et al.*, 1992; Pépin *et al.*, 1994)

1.3.1 - Resposta Imune Inata

Pouco se sabe sobre a resposta inata gerada por *C. pseudotuberculosis*, o que se sabe é que no estágio inicial pós-infecção, neutrófilos e macrófagos agem como principais células envolvidas na resposta imune contra *C. pseudotuberculosis* (Hard, 1969). Estas células mostraram uma participação crítica na formação de uma resposta efetiva em uma infecção primária e secundária (Lan *et al.*, 1999). A fagocitose por macrófagos leva a posterior formação de granulomas, estes funcionam como um mecanismo de defesa contra a dispersão deste microorganismo (Hard, 1972). A dificuldade da eliminação da *C. pseudotuberculosis*, por macrófagos, aparentemente se deve a baixa produção de óxido nítrico (NO) quando estimulados com frações antigênicas de *C. pseudotuberculosis* (Bogdan *et al.*, 1997). A baixa produção de NO após estimulação com componentes desta bactéria, pode ser um fator que explicaria o desenvolvimento de infecções crônicas em pequenos ruminantes.

A produção de citocinas pró-inflamatórias de ação ativadora de células efectoras, como IFN- γ e TNF- α , também foram observados nos dias iniciais pós-infecção (Lan *et al.*, 1998).

1.3.2 - Resposta imune adquirida

A participação da resposta imune adquirida tem sido observada principalmente através do uso e avaliação da eficácia de vacinas à base de toxóides ou toxinas geneticamente inativadas. Com o uso destas, pode-se observar que, após o desafio, os animais imunizados apresentavam um menor número de linfonodos comprometidos quando comparados com animais dos grupos controles.

Além da diminuição de linfonodos acometidos em animais imunizados, o uso de vacinas a base de toxóides também mostrou redução no número de granulomas distribuídos pelos órgãos dos animais. Alguns trabalhos, como o do Yozwiak & Songer (1993), mostraram que anticorpos anti-PLD, inoculados nos animais antes da infecção por *C. pseudotuberculosis*, induziram um papel protetor, dificultando a disseminação desta bactéria para os linfonodos e demais regiões dos animais infectados. A proteção contra bactérias intracelulares facultativas, como no caso da *C. pseudotuberculosis*, está fortemente relacionada à expansão de células T CD4, principalmente as células T helper 1 (Th1), devido a grande produção de IFN- γ e TNF- α , que são citocinas que tem como função ativar as células da resposta imune inata, como por exemplo, os macrófagos. O uso de anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, em um segundo desafio, levou ao aumento da letalidade em modelos murinos e redução da produção das citocinas pró-inflamatórias com capacidade de induzir atividade de células efectoras da resposta imune inata. Isto mostra que ambas as populações de linfócitos são necessárias para garantir uma resposta rápida e gerar proteção contra *C. pseudotuberculosis* (Lan *et al.*, 1998).

Com o auxílio de técnicas imuno-histoquímicas, foi possível mostrar a composição do granuloma causado por *C. pseudotuberculosis*. Estas lesões são formadas inicialmente por uma lesão central necrótica cercada por macrófagos, estes macrófagos são rodeados por células T CD4 e T CD8 e na região mais externa, próximos à cápsula fibrosa, há uma maior distribuição de células T $\gamma\delta$, cujas funções não são bem conhecidas, mas sabe-se que possuem papel na ativação de macrófagos, e algumas células B (Walker *et al.*, 1991).

O estudo dos perfis de citocinas induzidos por *C. pseudotuberculosis* mostrou uma grande participação das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , principalmente no local inicial da infecção, sendo que o TNF- α tem participação crucial na fase primária da infecção. A estimulação da produção de TNF- α ocorre por

componentes ainda não identificados em *C. pseudotuberculosis* (Ellis *et al.*, 1991c), e Pépin *et al.* (1997) mostraram que a produção de IFN- γ incide de forma independente ao fator de virulência PLD.

Testes realizados para avaliar a resposta imune humoral mostraram que *C. pseudotuberculosis* gera uma forte resposta imune. Através de técnicas de Western Blot, utilizando antígenos de parede celular, células mortas e sobrenadantes de culturas em caldo Brain Heart Infusion (BHI), mostrou-se que soros de animais infectados por esta bactéria reconheceram uma grande gama de antígenos bacterianos (Muckle *et al.*, 1992). Testes de ELISA, realizados por Paule *et al.* (2003) em cabras, mostraram que animais infectados por *C. pseudotuberculosis* apresentaram um padrão similar de produção de IgG, com um pico de produção em torno do décimo primeiro dia após a infecção. Contudo, estas respostas humorais não são suficientes para conter e eliminar esta bactéria, uma vez que estudos utilizando sobrenadantes e concentrados combinados com proteínas secretadas estimularam forte resposta humoral, mas sem prevenir o desenvolvimento da doença. (Moura-Costa *et al.*, 2008).

1.4 - Macrófagos

Os macrófagos possuem um papel fundamental na proteção contra a LC. Estas células fagocitárias são umas das primeiras a serem recrutadas e a entrarem em contato com a *C. pseudotuberculosis* durante a infecção (Hard, 1969). Os macrófagos têm sido considerados importantes células imunes efectoras relatadas há mais de cem anos. Assim, desde a sua descoberta, os imunologistas têm se preocupado com o papel efector destas células. (Nathan C. 2008)

Os macrófagos são células fagocíticas, responsáveis por limpar aproximadamente 2×10^{11} eritrócitos por dia, isto equivale a 3 kg de ferro reciclado para o uso do hospedeiro. Este processo é vital para a sobrevivência de muitos organismos. Além disso, os macrófagos estão envolvidos na remoção de restos celulares e de células em processo de apoptose (Mosser & Edwards, 2008). O principal papel dos macrófagos não está envolvido no processo de ativar o sistema imune, mas sim funcionar como uma célula “zeladora” nos organismos, onde sua principal função é a manutenção do ambiente intersticial, limpando-o de materiais celulares estranhos (Mosser & Edwards, 2008).

Muitos são os mecanismos capazes de gerar uma mudança no perfil de ativação dos macrófagos. Entre eles, podemos citar sinais endógenos de perigo, que sinalizam um dano tecidual (como por exemplo, proteínas de choque térmico, proteínas nucleares, DNA e outros componentes da matriz extracelular) (Zhang & Mosser, 2008), além de fatores de sinalização, como a produção diferencial de citocinas Th1 e Th2 da resposta imune inata e adaptativa, que são capazes de levar ao aumento da produção de fatores com atividade antimicrobial ou levar à susceptibilidade a infecções (Mackaness, 1977).

Os macrófagos são encontrados em praticamente todos os tecidos e se diferenciam a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) que circulam no organismo. Estas células desenvolvem-se de um progenitor mielóide na medula óssea, o qual origina muitas outras células como, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas, mastócitos e os próprios macrófagos. Durante o desenvolvimento dos monócitos, o progenitor mielóide (chamados de unidades formadoras de macrófagos/granulócitos), dá origem, em sequência, aos monoblastos, pro-monócitos e por último aos monócitos, que são liberados na corrente sanguínea, e que posteriormente reabastece o organismo com macrófagos e outras células. Estas células migram para dentro de um determinado tecido, em um estado estável ou em resposta a sinais inflamatórios (Gordon & Taylor, 2005).

1.4.1 - Perfis de Ativação dos Macrófagos

Os macrófagos são capazes de responder a diferentes estímulos de diferentes formas, isto marca um ponto fundamental da resposta aos agentes ambientais externos tais como injúria ou infecção. Estes macrófagos podem também ser ativados através de células da resposta imune inata. Os macrófagos também respondem a sinais produzidos por células imunes antígeno-específicos, estes sinais dão origem a alterações mais duradouras e persistentes nos macrófagos. Além do mais, os próprios macrófagos podem produzir várias substâncias capazes de influenciar seu próprio status de ativação (Gordon, 2007).

Uma classificação muito usada para determinar os tipos de respostas que os macrófagos geram é a designação M1 (macrófagos ativados de forma clássica) e M2 (macrófagos ativados de forma alternativa), que marcam tipos fenotípicos distintos de

macrófagos a um determinado tipo de resposta (Gordon, 2003). Entretanto, esta classificação não compreende corretamente as populações de macrófagos, uma vez que, o grupo M2 compreende todos os outros tipos de macrófagos, os quais possuem uma dramática diferença em sua fisiologia e bioquímica (Edwards *et al.*, 2006). Desta forma Mosser & Edwards (2008), sugeriram uma nova forma de classificar os grupos de macrófagos, onde estes são divididos em três principais grupos: primeiro os de defesa do hospedeiro (macrófagos ativados de forma clássica); segundo, cicatrizadores/reparadores (macrófagos ativados de forma alternativa) e terceiro, reguladores. Macrófagos com fenótipos intermediários também poderiam existir entre os grupos, e este raciocínio está explicado na Figura 1, onde cada grupo principal é representado por uma das cores primárias (amarelo, azul e vermelho), e grupos secundários de macrófagos são representados por cores secundárias. Os dois primeiros tipos de macrófagos são responsáveis por induzir a expressão do gene *Slc7A2*, este gene codifica o transportador de membrana CAT2B, responsável de transpor o L-arginina, substrato usado para produção de intermediários microbicidas, nos macrófagos ativados de forma clássica, e responsáveis por induzir a produção de colágeno e poliaminas, que são efetores para reparo do tecido e indução de proliferação celular.



Figura 1 – Distribuição representativa de cores para perfis de ativação de macrófagos. Três cores primárias caracterizam as três principais populações de macrófagos, sendo que as cores intermediárias, entre as cores primárias, caracterizam as subpopulações com fenótipos intermediários entre as populações principais (Adaptada de Mosser & Edwards, 2008).

1.4.1.1 - Macrófagos ativados de forma clássica

Os macrófagos de defesa do hospedeiro, mais comumente chamados de macrófagos ativados de forma clássica, são responsáveis por agirem como células efetoras durante respostas imunes. A combinação de duas citocinas, IFN- γ e TNF- α , no local de uma lesão poderia resultar no aumento da migração de macrófagos, o que leva, consequentemente, ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Este aumento leva à produção de ânions superóxidos, radicais de oxigênios e radicais de nitrogênios, responsáveis por aumentar a atividade antitumoral e antimicrobica destas células (O'Shea & Murray, 2008). Inicialmente, a produção de IFN- γ é suplantada pela ação das células *natural killer* (NK). Entretanto, esta disponibilização de IFN- γ é de vida curta, assim a ação da resposta imune adaptativa, através das células Th1, faz-se necessária para uma manutenção da população de macrófagos ativados de forma clássica. Estas células Th1 antígeno-específico são responsáveis por manter uma produção constante de IFN- γ , após a diminuição da produção de IFN- γ pelas células NK (Mosser & Edwards, 2008).

O papel destes macrófagos ativados de forma clássica na defesa do hospedeiro tem sido bem documentado (Mackaness, 1977; Gordon & Taylor, 2005; Dale *et al.*, 2008). Camundongos com ausência de produção IFN- γ apresentam maior susceptibilidade a microorganismos como protozoários, bactérias e vírus, e o mesmo é visto para humanos com deficiências neste padrão de sinalização (Filipe-Santos *et al.*, 2006). Entretanto, existe uma maior complexidade envolvendo a ativação destes macrófagos. Por exemplo, o grupo *Leishmania* é formado por parasitas intracelulares que se replicam em tecidos onde residem macrófagos. Estes protozoários não expressam ligantes para *Toll-like receptors* (TLR), fazendo com que não haja estimulação suficiente da produção de TNF- α e assim não haja uma ativação completa dos macrófagos, fazendo com que este parasita mantenha uma infecção com perfil crônico (Mosser & Edwards, 2008). Outro caso específico, envolvendo a espécie *Leishmania donovani*, mostrou que este patógeno interfere com o padrão de sinalização de produção de IFN- γ , impedindo uma eficiente ativação dos macrófagos e aumentando a sobrevivência deste protozoário (Nandan & Reiner, 1995). Outro exemplo é observado na bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, o qual está envolvida na produção de uma lipoproteína de 19 kDa que impede a produção de várias proteínas responsivas a IFN- γ responsáveis pela apresentação de antígenos (Pai *et al.*, 2003).

1.4.1.2 - Macrófagos ativados de forma alternativa ou Macrófagos de Cicatrização

Os macrófagos de cicatrização ou reparadores de tecidos, conhecidos como macrófagos ativados de forma alternativa, também têm seu perfil de ativação influenciado pela resposta imune inata ou adaptativa. Esta população é primeiramente induzida pela produção da IL-4 por basófilos e mastócitos, que são os fornecedores desta interleucina pelo sistema imune inato após injúria (Brandt *et al.*, 2000). Além de injúria, estas células também respondem à quitina, um biopolímero estrutural encontrado em fungos e parasitas, com a produção de IL-4. A produção precoce de IL-4 converte as populações residentes de macrófagos em macrófagos de cicatrização. A IL-4 estimula a atividade da enzima arginase nos macrófagos, convertendo L-arginina em ornitina, um precursor de poliaminas e colágeno, responsáveis, respectivamente, pela hiperplasia celular e produção da matriz extracelular (Kreider *et al.*, 2007). Existem duas distintas isoformas da enzima arginase (tipo I e II) em mamíferos, os quais são codificados por diferentes genes e possuem diferentes propriedades. A isoforma I é produzida no fígado e alguns tipos de células, como os macrófagos, enquanto que a isoforma II é produzida por quase todas as células (Li *et al.*, 2001). É importante salientar que o substrato L-arginina também é utilizado como substrato pela enzima *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), enzima esta responsável pela produção de radicais de nitrogênio. A produção de NO tem função primordial na inibição da função ou viabilidade de patógenos intracelulares e pode afetar células próximas, inibindo também sua viabilidade (Hoffman *et al.*, 1990). Assim, o direcionamento para a via da ornitina pode levar a diminuição da produção de NO e facilitar a manutenção de patógenos intracelulares no organismo.

A resposta imune adaptativa também é responsável pela produção de IL-4, e é através dela que é mantida a população de macrófagos de cicatrização. Respostas tipo T helper 2 (Th2) possuem um perfil de produção de citocinas envolvendo a produção das IL-4 e IL-13. Macrófagos tratados com estas citocinas falham em apresentar antígenos, produzir citocinas pró-inflamatórias e são menos eficientes para produzir espécies reativas de oxigênio e radicais de nitrogênio. Assim, estes macrófagos são menos eficientes no combate a patógenos intracelulares (Edwards *et al.*, 2006). Vários exemplos mostram a suscetibilidade a infecções intracelulares quando há respostas tipo Th2. Em estudos com o fungo *Cryptococcus neoformans*, foi mostrado que camundongos transgênicos para alta produção da citocina interleucina 13 (IL-13),

infectados por via intranasal, mostraram baixa sobrevivência quando comparados com camundongos deficientes para IL-13 (Müller *et al.*, 2007). Outro caso importante é que a produção de IL-4 pelas células Th2 induz a síntese da via das poliaminas, produzindo espermina. Esta via pode contribuir para o crescimento e prolongamento de infecções por *Leishmania major* (Kropf *et al.*, 2005). Por último, é relatado na literatura que a adição de IL-4 e IL-13, em cultura de macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, afetam a eliminação desta bactéria através da inibição da formação de autofagossomos usados na eliminação desta bactéria (Harris *et al.*, 2007).

1.4.1.3 - Macrófagos regulatórios

Como as demais populações de macrófagos, este grupo é ativado tanto através da resposta imune inata quanto a resposta adaptativa. Sinais, como o estresse, são responsáveis por ativar esta população de macrófagos através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais. São liberados Glucocorticóides pelas células adrenais e estes esteróides inibem a defesa mediada por macrófagos e suas funções inflamatórias pela inibição da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 12 (IL-12). Os glucocorticóides também são responsáveis por inibir a maturação de células dendríticas, diminuindo a apresentação antigênica, e inibindo respostas aloestimulatórias e eficiente ativação de células T (Sternberg, 2006).

Apesar de existir vários caminhos para a ativação deste perfil de macrófagos, ainda não se sabe exatamente qual é o principal sinal responsável por esta função. Muitos sinais como agonistas do receptor Toll (TLR) junto com imuno-complexos do tipo IgG, prostaglandinas e células apoptóticas são responsáveis pela indução da diferenciação destes macrófagos regulatórios (Mosser & Edwards, 2008). Estes macrófagos regulatórios são responsáveis por produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β), além de reduzir a produção de IL-12, que induz a diferenciação de células Th em Th1.

1.5 - Justificativa

A *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente causador da doença LC, acomete ovinos e caprinos de todo o mundo causando grandes perdas econômicas para

os criadores desses rebanhos. Na Austrália, onde 64% dos rebanhos estão infectados pela LC, levando em conta somente a produção de lã, as perdas industriais chegam a 15 milhões de dólares australianos, além de gastarem mais 10 milhões em inspeção e remoção de abscessos de carcaças em abatedouro de exportação (Paton, 1993; Paton *et al.*, 1988).

No Brasil, a LC é relatada desde 1918, por Duport (Garcia *et al.*, 1987), esta atinge 66,9% dos animais no Ceará (Pinheiro *et al.*, 2000). No Rio de Janeiro, a prevalência da LC variou de 3,6 a 100% (Langenegger *et al.*, 1991), e como dito anteriormente, em estudos sorológicos realizado pelo nosso grupo, em Minas Gerais, a prevalência da LC foi de 75,8% em ovinos e 78,9% em caprinos (Guimarães *et al.*, 2009 e 2010). Todo este montante de animais apresentando esta enfermidade ocasiona redução da produção de lã, carne, leite, e ainda leva à condenação de carcaças e peles dos animais infectados.

Para tentar contornar estes problemas é interessante o desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem uma possível aplicação para o tratamento e eliminação da LC. E para isto, estudos da interação de *C. pseudotuberculosis* com culturas de macrófagos se tornam boas alternativas, uma vez que este tipo de estudo mimetiza o que ocorre entre as células do hospedeiro com a bactéria durante o processo de infecção, devido ao fato que a *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo. Assim resultados mostrando uma resistência maior dos macrófagos ou produção de resposta defensiva contra a infecção da bactéria mutante, em relação à linhagem selvagem, será um complemento aos demais experimentos relativos ao controle e tratamento do *C. pseudotuberculosis*. É importante destacar que a proposta por caracterização da resposta de macrófagos, frente à infecção por *C. pseudotuberculosis*, é uma proposta inédita para esta bactéria, aonde este trabalho vem como pioneiro em relação a *C. pseudotuberculosis*.

A escolha da linhagem CP13 para o estudo em culturas de macrófagos deve-se ao fato de que é uma linhagem promissora para uso em imunoprophylaxia em ovinos e caprinos. Esta linhagem alcançou percentual de 81% de proteção em camundongos desafiados com uma linhagem altamente virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Outro ponto importante sobre o uso dessa linhagem é que este trabalho ajudará na compreensão do mecanismo de resposta imune gerada por esta bactéria, e a partir destes resultados poderemos inferir como, em geral, o hospedeiro responde à infecção por *C. pseudotuberculosis*.

Com intuito de testar e ampliar o conhecimento em relação ao mutantes de CP13 de *C. pseudotuberculosis*, obtidos pelo LGCM (Laboratório de Genética Celular e Molecular) e da sua linhagem parental T1, o uso da cocultura, possibilitará um enfoque aprofundado em relação à ação do *C. pseudotuberculosis* durante a infecção em macrófagos. Assim, esta pesquisa de base pode ser levada ao aplicado, facilitando a seleção de vacinas com alto índice de proteção, através da seleção do perfil de resposta mais apropriado ao combate da infecção.

2 – Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar, *in vitro*, o perfil fenotípico de cultura primária de macrófagos frente à infecção pelo linhagem selvagem T1 e sua linhagem mutante CP13 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar a resposta da cultura primária de macrófagos infectados com o mutante CP13 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para análises da:
 - Viabilidade celular;
 - Produção de óxido nítrico (NO);
 - Atividade da enzima Arginase I;
 - Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS);
 - Produção das citocinas IL-10, TNF- α e TGF- β
- Avaliar a expressão relativa dos genes “iNOS” e “Arginase I” “e CAT2b” por RT-qPCR

3 - Material e Métodos

3.1 - Linhagens bacterianas

A linhagem selvagem T1 de *C. pseudotuberculosis* usada neste trabalho foi fornecida pelo Dr. Roberto Meyer, da Universidade Federal da Bahia. A linhagem mutante CP13, obtida no Laboratório de Genética Celular e Molecular (Dorella, 2006), através da transposição aleatória do transposon TnFuZ (Gibson & Caparo, 2002), também foi usada neste trabalho.

A linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, linhagem naturalmente atenuada, isolada de cabras e com genoma já sequenciado e disponibilizado no NCBI sobre acesso NC_17300, foi usada somente para o teste de mensuração da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Esta linhagem servirá como controle de produção de ROS para as linhagens T1 (selvagem) e CP13 (originada da selvagem), devido a sua característica de induzir a produção de ROS.

3.2 - Cultivo bacteriano e contagem

As linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram crescidas aerobicamente em meio *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia Manufacturers, Inc., Baltimore, MD, USA) suplementado com ágar e incubadas por três dias em estufa à 37°C. Posteriormente, uma colônia de cada linhagem foi inoculada em 30 ml de caldo BHI e incubada em estufa a 37°C. Após atingir a densidade óptica de $D_{600nm}=1-1,5$, alíquotas de 800 µl deste inóculo foram distribuídas em *ependorfs* de 1,5 ml com mais 200µL de glicerol 80%. Foram feitas diluições seriadas de 1:10 e estas diluições foram plaqueadas em BHI-ágar e crescidas por três dias em estufa à 37°C para posterior contagem (Dorella *et al.*, 2006).

3.3 - Obtenção de macrófagos de medula

Camundongos da linhagem BALB/c fêmeas de 6-8 semanas foram utilizados para obtenção dos macrófagos de medula. As células da medula óssea foram obtidas a partir do lavado do fêmur e tíbia dos camundongos BALB/c fêmeas com PBS suplementado com 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (GIBCO). Para diferenciação dos monócitos em macrófagos, as células foram incubadas em placas

de petri (Prolab, BR) por nove dias em meio DMEM F12 (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Nutricell), 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina (GIBCO), 2mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 10³ U/mL de GM-CSF (Peprotech, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Após este período, os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado, as células foram contadas em câmaras de Neubauer (Improved) e então plaqueadas nas concentrações específicas para cada ensaio.

3.4 – Infecções de macrófagos de medula com as linhagens T1 e CP13

Os macrófagos obtidos foram infectados com as linhagens de *C. pseudotuberculosis* em placas de 96, 48 e 24 poços (TPP), de acordo com o teste realizado. Após a padronização da multiplicidade de infecção (MOI), através do teste de MTT, ficou definida a proporção de um macrófago por bactéria (1:1) e um macrófago por cinco bactérias (1:5). A contagem final de macrófagos/poços utilizada dependeu do tipo de teste a ser realizado. Todos os testes foram realizados por pelo menos três vezes para validação dos dados.

3.5 - Avaliação do perfil fenotípico de macrófagos em cocultura com o mutante CP13 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

3.5.1 - Padronização da Multiplicidade de Infecção (MOI) através da mensuração da viabilidade celular pelo teste MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolium):

A padronização do MOI foi realizada com o intuito de determinar a concentração adequada de bactérias por macrófagos, de forma que estes macrófagos produzissem uma resposta satisfatória passível de mensuração.

Macrófagos foram distribuídos em placas de 96 poços em uma quantidade de 10⁶ células/poço após 24h de incubação em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As linhagens T1 e CP13 foram distribuídas, individualmente, em poços com macrófagos em cinco réplicas para ambas as linhagens bacterianas. Os testes foram

realizados nos MOIs 1:1 e 1:5 para cada uma das linhagens e por um período de 24 horas.

O teste foi realizado como descrito por Mosmann (1983) com algumas alterações: os macrófagos foram co-incubados com *C. pseudotuberculosis* de acordo com os MOIs 1:1 e 1:5, e após duas horas de infecção as bactérias que não sofreram internalização pelos macrófagos foram removidas por lavagem dos poços com PBS aquecido a 37°C, procedimento repetido por três vezes. Em seguida, foi adicionado meio DMEN aos poços e adicionados 10µL MTT dissolvidos em PBS. Procedeu-se o ensaio por mais 24h em estufa a 37°C com 5% de CO₂, protegido da luz. Após este período, foram adicionados 100µL de dimetilsulfóxido DMSO (Q BioGene, CA, EU) e as culturas foram lidas em espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra) para mensuração em comprimento de onda de 492nm.

3.5.2 - Mensuração da produção de óxido nítrico da cultura:

Para este ensaio os macrófagos diferenciados de medula (1x10⁶ células/mL) foram incubados em placas de 48 poços e estimulados com IFN-γ por 24 horas. Após este tempo, os macrófagos foram incubados com as linhagens CP13 e T1, isoladamente. O experimento foi realizado em triplicata para cada grupo (Tabela 1). Após 24 horas de infecção, os sobrenadantes destas culturas foram coletados e utilizados para dosagem de produção de nitrito (NO₂⁻) pela reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Resumidamente, 50 µL do sobrenadante coletado de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços. A cada poço, incluindo o padrão e o branco, foram adicionados 100 µL de uma solução 1:1 de 50µL de solução de sulfanilamida 1% (Sigma) e 50µL de solução de naftietileno-diamina 1% (Sigma) diluídos em H₃PO₄ 2,5% em temperatura ambiente por 5 minutos no escuro, após 10 minutos foi realizada a leitura em leitor de ELISA em 540 nm. O resultado foi expresso em µM.

Para a curva padrão foi distribuído no primeiro poço 50µL de meio DMEN e posteriormente foram adicionados 100µL de Nitrito de sódio à 250µM. Em seguida foram feitas oito diluições sucessivas (1:2). O branco consistiu de 50µL de meio DMEN mais 100µL da solução de sulfanilamida e naftietileno-diamina.

Tabela 1 – Grupos usados no teste de dosagem indireta da produção de óxido nítrico

Grupos:
Macrófago (MØ)
MØ + IFN- γ (Macrófagos + IFN- γ)
MØ + T1 + IFN- γ (Macrófagos + linhagem T1 + IFN- γ)
MØ + CP13 + IFN- γ)Macrófagos + linhagem CP13 + IFN- γ)

3.5.3 - Mensuração da atividade da enzima arginase I:

A atividade da enzima arginase I foi mensurada de acordo com o protocolo previamente descrito por Corraliza *et al.* (1994) com algumas modificações. Os macrófagos (1×10^6 /poço) foram obtidos como descrito anteriormente, distribuídos em placas de cultura de tecidos de 48 poços e incubados por 24 horas. Após este período as linhagens T1 e CP13 foram adicionadas, individualmente, aos seus respectivos poços, formando os grupos descritos na Tabela 2. Cada grupo foi realizado em triplicata. Logo em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, por 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior utilização. As células aderidas à placa foram lisadas com a adição de 100µL de Triton-X (0,1%) e deixadas em agitação por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 100µL de MnCl₂ 10mM e 100µL de Tris HCl 50mM que agem como cofatores da ativação da enzima arginase I. Posteriormente a placa foi colocada em banho-maria por 10 min à 55°C para a ativação da enzima. Transcorrido este tempo, foram transferidos 50 µL do material lisado para outra placa e adicionados 25µL de L-ARGININA 0.5M. A reação de hidrólise da L-ARGININA foi realizada em uma estufa a 37°C por 60 minutos e após este tempo uma solução de parada contendo ácido sulfúrico, ácido fosfórico e água, na proporção 1:3:7, foi adicionada a cada poço. Em seguida, foi adicionado α -isonitrosopropiophenone 9%, diluído em etanol, em cada poço e as placas foram colocadas em banho-maria a 95°C por 45 minutos. Então, 100 µL de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços e realizada a leitura em leitor de ELISA em 540nm. O resultado foi mensurado da forma que uma unidade da enzima catalisa a formação de 1µmol de ureia/min.

Tabela 2 – Grupos usados no teste de mensuração da atividade da enzima arginase I.

Grupos:
Macrófago (MØ)
MØ + IL-4 (Macrófagos + citocina IL-4)
MØ + T1 (Macrófagos + Linhagem T1)
MØ + CP13 (Macrófagos + Linhagem CP13)

3.5.4 - Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Macrófagos foram distribuídos em placas de cultura de células de 96 poços (1×10^6 células/poço). Estas células foram coincubadas com as linhagens de *C. pseudotuberculosis*, formando os grupos listados na Tabela 3.

Tabela 3 – Grupos usados na dosagem da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).

Grupos:
MØ (macrófagos)
MØ + Zymosan (Macrófagos + Zymosan)
MØ + T1
MØ + CP13
MØ + 1002 (Macrófagos + Linhagem 1002)

O protocolo seguiu-se de acordo com Trusk *et al.* (1978), com algumas alterações: após a obtenção dos macrófagos diferenciados da medula óssea, os mesmos foram suspensos em RPMI 1640 sem vermelho de fenol (GIBCO). Em seguida, as linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram adicionadas em seus respectivos poços, formando os grupos representados na Tabela 3. Como controle positivo da reação foram utilizados 50µL contendo 10^7 partículas de Zymosan (Sigma). 20 µL de luminol foram adicionados em cada um dos poços e a leitura da placa foi realizada a cada intervalo de dois minutos durante duas horas utilizando o aparelho Lumicount™ (Packard Bioscience Company)

3.5.5 - Dosagem da produção das Citocinas IL-10, TNF- α e TGF- β

As dosagens de TNF- α , IL-10 e TGF- β a partir do sobrenadante de cultura primária de macrófagos, infectados pelas linhagens T1 e CP13 no MOI 1:5, foram feitas utilizando os kits da BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA) exclusivos para a detecção das citocinas TNF- α e IL-10 e o kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA) para detecção de TGF- β . Todos os procedimentos foram feitos exatamente como recomendado pelos fabricantes. O limite de detecção foi de 32 pg/mL para as citocinas TNF- α e IL-10 e para TGF- β o limite de detecção foi de 30 pg/mL.

3.6 - Mensuração da expressão relativa dos genes das enzimas iNOS, arginase I e do transportador CAT2B

3.6.1 - Extração de RNA

Macrófagos (1×10^6 células/poço) foram distribuídos em placas de cultura de tecidos de 48 poços e incubados com e sem as citocinas IFN- γ e IL-4, por 24 horas. Após este tempo, foram adicionadas as linhagens T1 e CP13, individualmente, nos respectivos poços formando os grupos listados na Tabela 1. Em seguida, estas placas foram incubadas por mais 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Transcorrido este tempo, o sobrenadante foi coletado e armazenado para outros fins. O RNA total foi isolado dos macrófagos com a adição de 100 μ L de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por poço. Após 10 minutos o sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos eppendorfs (Qiagen). Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen, ALE) para cada mL de TRIZOL utilizado. As amostras foram homogeneizadas, incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x *g* durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior cor de rosa composta por fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permaneceu na fase aquosa, a qual foi transferida para um microtubo novo. Para precipitar o RNA da fase aquosa, foram adicionados 500 μ L de isopropanol (Merck) para cada mL de TRIZOL utilizado e a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida,

o material foi centrifugado a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado em 1 mL de etanol 75% (Merck) em água tratada com DEPC (USB Corp., Cleveland, OH, EUA) e centrifugado a 7.500 x *g* por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O RNA precipitado foi diluído em 50 µL de água livre de RNase, e armazenado a -70°C. A quantificação de RNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

3.6.2 - Síntese de cDNA

As amostras de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa na qual foi empregado o *kit* “High Capacity cDNA Master Mix”, segundo as recomendações do fabricante. Para a realização destas reações foram utilizadas as mesmas quantidades de RNA total das alíquotas provenientes dos demais grupos realizados na cultura de macrófagos.

3.6.3 – PCR em tempo Real (qPCR)

Amostras de cDNA obtidas através da técnica de transcrição reversa foram submetidas a reações de qPCR utilizando diferentes combinações de iniciadores (Tabela 4).

Tabela 4 - Combinações de iniciadores utilizados no ensaio de RT-PCR

Alvo	Iniciador (5'-3')
<i>Hprt</i>	Fw:
	CAGCTCGTGTCGTGAGATGT
	Rv:
	CTCTCATGAGTCCCCACCAT
<i>iNOS</i>	Fw:
	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC
	Rv
	GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG
<i>Arginase 1</i>	Fw:
	CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT
	Rv:
	CTGGCAGTTGGAAGCATCTCT
<i>CAT2B</i>	Fw:
	TCAATTCCAAAACGAAGACACCAGTA
	Rv:
	AGGTCAAAAAGAAAGGCCATCACA

A reação de qPCR foi realizada utilizando-se a plataforma de modelo 7900 (7900 Real-Time PCR System). A concentração dos reagentes e as condições de amplificação estão descritas nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela – 5 Reagentes e suas quantidades utilizadas nas reações de qPCR

Reagente	Volume por reação
Master Mix (Applied Biosystems)	6 µL
Iniciador senso	1,0 µL
Iniciador anti-senso	1,0 µL
Amostra de cDNA	1,0 µL (ausente para N.T.C.)
H ₂ O mili-Q estéril	q.s.p. 1,0 µL

Tabela 6 - Parâmetros selecionados no termociclador para o processamento das reações de qPCR.

Etapa da reação de qPCR	Subetapa da reação de qPCR	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	-	95 °C	10 min
Estágio cíclico (45 repetições)	Desnaturação	95 °C	15 s
	Anelamento e extensão de iniciadores	60 °C	1 min
Análise de dissociação contínua ¹	Desnaturação	95 °C	15 s
	Renaturação	60 °C	1 min
	Desnaturação	95°C	30 s

A reação de qPCR ocorreu, para cDNAs obtidos para cada grupo de macrófagos, de acordo com a tabela 7. A reação de qPCR ocorreu com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene escolhido como normalizador, o gene *hprt* (cinco réplicas), e com os oligonucleotídeos iniciadores para os genes de interesse das enzimas iNOS, arginase I e do transportador CAT2b (três réplicas), listados na Tabela 4.

Tabela 7 – Grupos usados para análise da expressão gênica por qPCR

Alvos do qPCR	CAT2B	
	iNOS	arginase I
Grupos	Macrófago (MØ)	Macrófago (MØ)
	MØ + IFN- γ	MØ + IL-4
	MØ + T1 + IFN- γ	MØ + T1
	MØ + CP13 + IFN- γ	MØ + CP13

3.7 - Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP) para cada grupo. Para determinar diferenças entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* de Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. As diferenças observadas foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 – Resultados

4.1 - Viabilidade Celular (MTT)

O ensaio de viabilidade pelo reagente MTT (Mossman, 1983) é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade das células. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenase, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o substrato metiltetrazólio (MTT) solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água.

Em relação à mensuração da viabilidade das culturas de macrófagos em cocultura com as linhagens de *C. pseudotuberculosis*, obtivemos resultados diversos dependendo da taxa de infecção utilizada nos experimentos. Foi observado que, no MOI 1:1, a viabilidade da cultura de macrófagos sofreu redução estatisticamente significativa somente quando coincubado com a linhagem CP13 de *C. pseudotuberculosis*, onde esta cultura mostrou uma viabilidade celular de aproximadamente 86% (Figura 2). O cálculo do valor da taxa de sobrevivência celular foi realizado tomando-se como referência o valor de 100% de sobrevivência da cultura de macrófagos que não foi infectada *in vitro* com nenhuma das linhagens de bactéria.

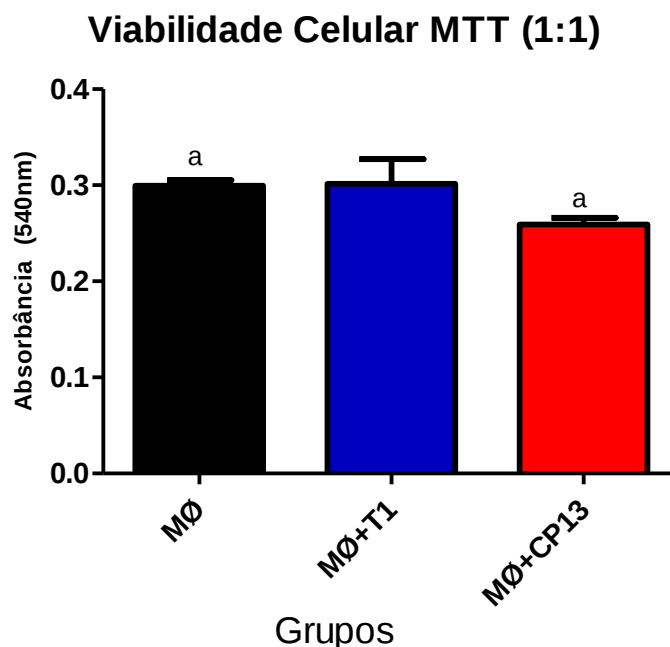


Figura 2 – Gráfico de viabilidade Celular (MOI 1:1) Cocultura de macrófagos com as linhagens de bactéria CP13 e T1. O ensaio de MTT foi realizado 24h após a infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significam variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

Quando analisamos a viabilidade das culturas de macrófagos no MOI 1:5, observamos, para ambas as linhagens, uma redução estatisticamente significativa em relação à cultura de macrófagos controle. Macrófagos incubados com as linhagens T1 (Grupo MØ+ T1) e macrófagos incubados com linhagem CP13 (Grupo MØ+ CP13) de *C. pseudotuberculosis* apresentaram uma viabilidade das culturas celulares de aproximadamente 39% e 45%, respectivamente (Figura 3).

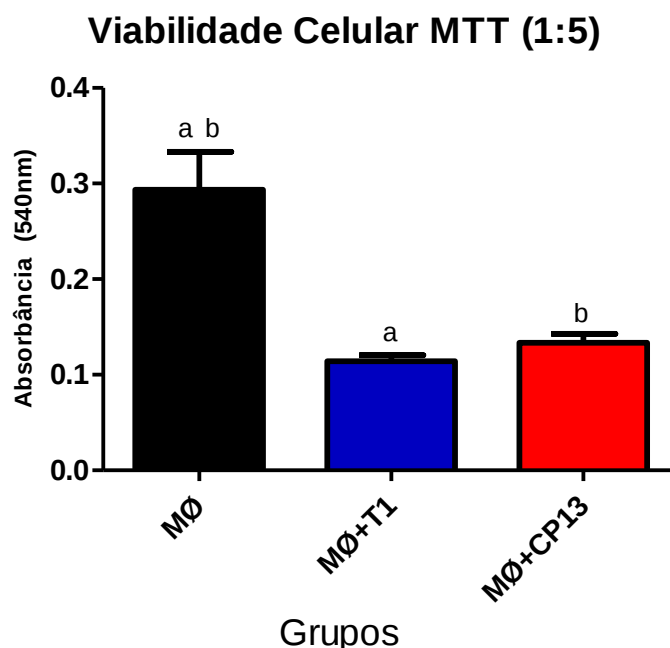


Figura 3 – Viabilidade Celular (MOI 1:5). Cocultura de macrófagos com as linhagens de bactéria CP13 e T1. O ensaio de MTT foi realizado 24h após a infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student)

4.2 - Produção de óxido nítrico (NO)

A fim de determinar se as diferentes linhagens de bactérias seriam capazes de induzir distintos perfis de ativação dos macrófagos, realizamos primeiramente a dosagem de produção de NO, importante parâmetro de ativação clássica deste tipo celular. Como mostrado na Figura 4, para o MOI 1:1, a infecção por ambas as linhagens, T1 e CP13, após ativação prévia dos macrófagos com IFN- γ , levou

a um aumento na produção de NO. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de indução de NO quando comparamos as duas linhagens.

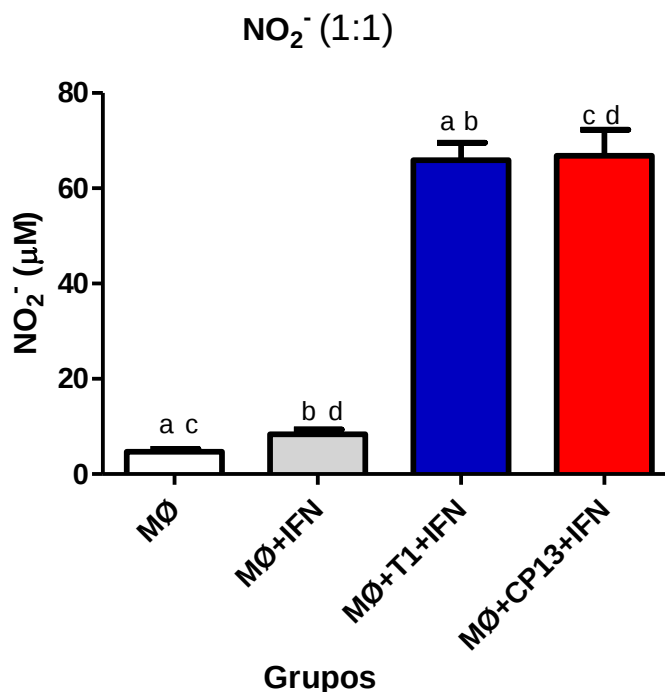


Figura 4 – Mensuração da produção de NO (MOI 1:1). Cocultura de macrófagos, suplementados com IFN- γ , com as linhagens de bactéria CP13 e T1. O ensaio de para dosagem de NO foi realizado 24h após a infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

Para o MOI 1:5, foi observado que, novamente, a simples presença da bactéria, ou mesmo o estímulo IFN- γ isoladamente não foram suficiente para induzir aumento da produção de NO (Figura 5). Entretanto, quando comparamos o aumento da produção de NO para os macrófagos previamente ativados com IFN- γ e posteriormente infectados com as linhagens bacterianas encontramos diferença no padrão de produção. Assim, para esta maior taxa de infecção, a linhagem CP13 foi capaz de induzir um aumento maior de NO quando comparada com a linhagem T1 (Figura 5).

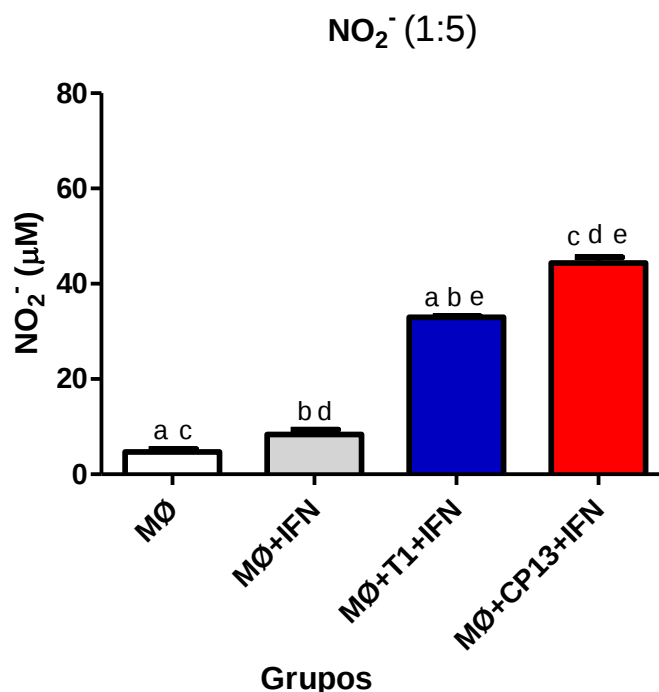


Figura 5 – Mensuração da produção de NO (MOI 1:5). Cocultura de macrófagos, suplementados com IFN- γ , com as linhagens de bactéria CP13 e T1. O ensaio de para dosagem de NO foi realizado 24h após a infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

Quando comparados os resultados de produção de NO₂⁻, entre os MOIs 1:1 e 1:5, dos grupos testes usados, observamos variação estatisticamente significativa entre os grupos dependente da taxa de infecção. Assim, macrófagos previamente estimulados com IFN- γ e posteriormente coincubados com T1 (1:1) apresentaram maior produção de NO do que macrófagos nas mesmas condições infectados em um MOI de 1:5. O mesmo efeito foi observado para a linhagem CP13 (Figura 6). Assim, à medida que o número de bactérias por macrófago aumenta, ocorre uma diminuição da produção de NO₂⁻ para ambas as linhagens(Figura 6).

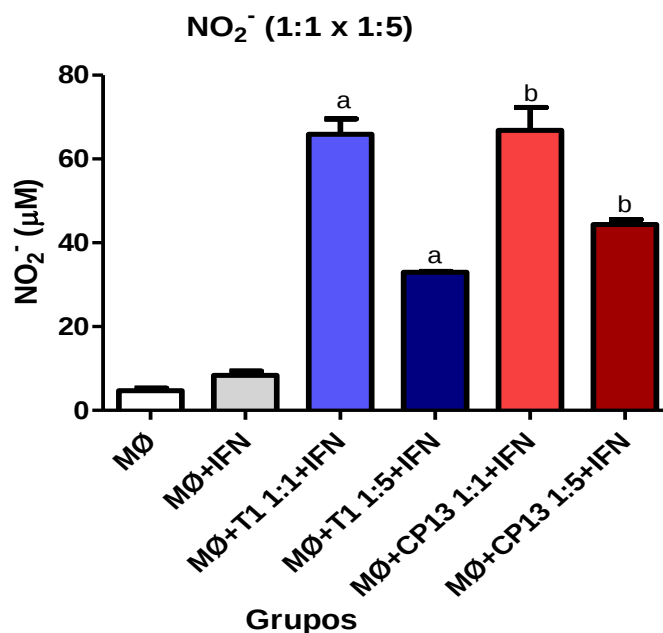


Figura 6 – Mensuração da produção de NO (MOI 1:1 x 1:5). Cocultura de macrófagos, suplementados com IFN- γ , com as linhagens de bactéria CP13 e T1. O ensaio de para dosagem de NO foi realizado 24h após a infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

4.3 - Atividade da enzima arginase I

A produção de NO a partir do metabolismo de L-arginina é importante parâmetro de ativação clássica de macrófagos. Por outro lado, este aminoácido pode ser metabolizado através de outra via, pela enzima arginase I, levando a produção de poliaminas. Esta via é uma característica de macrófagos ativados de forma alternativa. Assim, para analisar se as linhagens de bactérias poderiam induzir esta via de ativação de forma distinta, analisamos a atividade da enzima arginase pelos macrófagos. Interessantemente, a atividade da enzima arginase foi inibida nos macrófagos infectados com ambas as linhagens para o MOI 1:1 (Figura 7). Quando comparamos o efeito entre as linhagens, encontramos uma maior redução da atividade desta enzima na presença de CP13, em relação a T1. Para este ensaio utilizamos como controle positivo a cultura de

macrófagos ativados com IL-4, importante citocina indutora da atividade e expressão desta enzima.

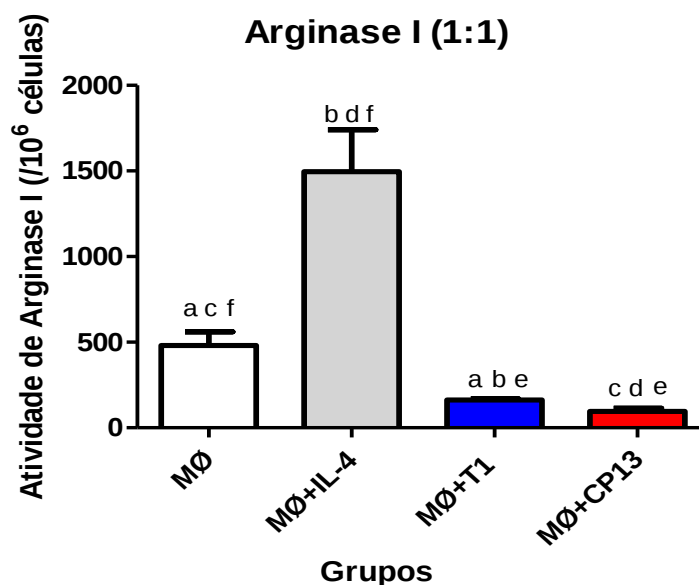


Figura 7 – Mensuração da atividade da enzima Arginase I (MOI 1:1). Cocultura de macrófagos com as linhagens de bactéria CP13 e T1. O ensaio de mensuração da atividade da enzima arginase foi realizado 24h após a infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

Em relação à atividade da enzima arginase I para o MOI 1:5, não foi observada variação estatisticamente significativa entre os grupos: macrófagos incubados com a linhagem CP13 (Grupo MØ+ CP13) e macrófagos incubados com a linhagem T1 (Grupo MØ+ T1). Entretanto, observamos redução significativamente estatística entre os grupos citados anteriormente e o grupo controle, macrófagos suplementados com a citocina IL-4 (MØ+IL4) e aumento estatisticamente significativo entre os grupos MØ+ T1 e MØ+ CP13, quando comparados com o grupo controle macrófagos sem coincubação com bactérias (MØ) (Figura 8). Desta forma, é importante ressaltar que para ambas as linhagens de bactéria observou-se um aumento na atividade da enzima arginase na medida em que houve um aumento na taxa de infecção, variando de 1:1 para 1:5 (Figura 9).

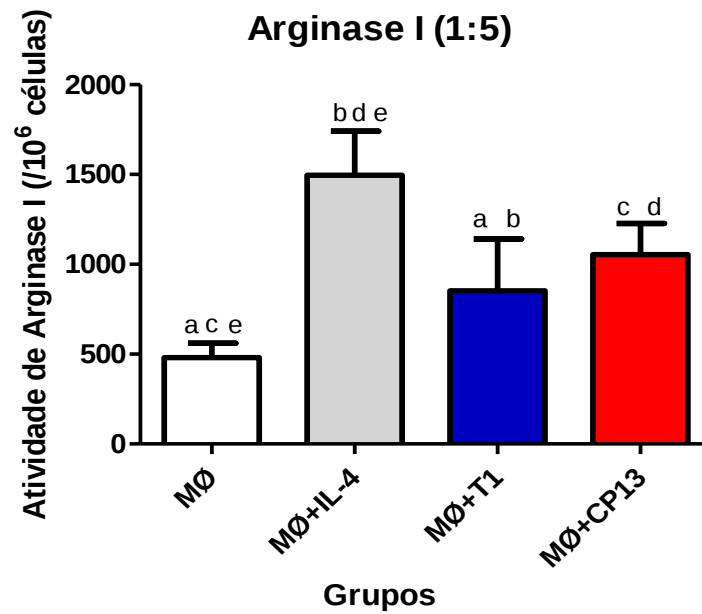


Figura 8 – Mensuração da atividade da enzima arginase I (MOI 1:5). Cocultura de macrófagos com as linhagens de bactéria CP13 e T1. O ensaio de mensuração da atividade da enzima arginase foi realizado 24h após a infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

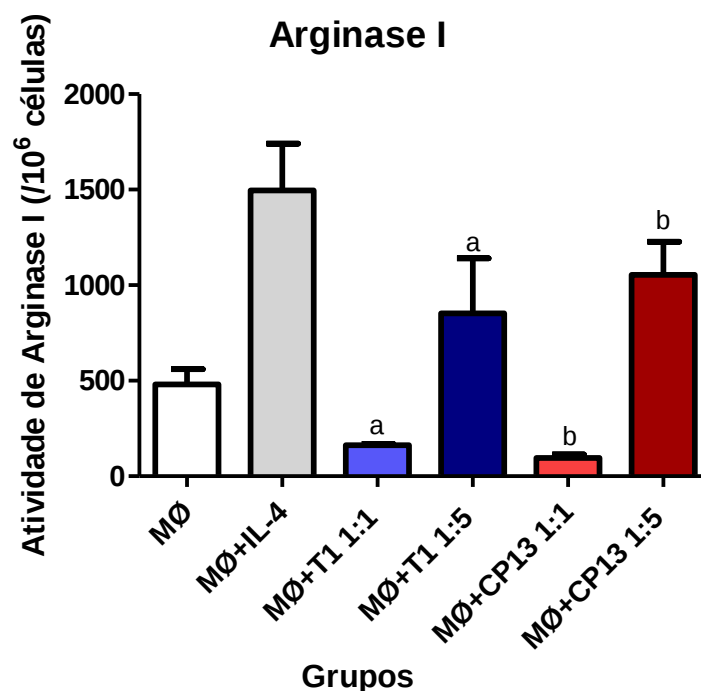


Figura 9 – Mensuração da atividade da enzima arginase I (MOI 1:1 x 1:5). Cocultura de macrófagos com as linhagens de bactéria CP13 e T1. O ensaio de mensuração da atividade da enzima arginase foi realizado 24h após a infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

4.4 - Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Além da produção de NO, importante para eliminação de parasitos intracelulares, e atividade de arginase, já descrita como fator de suscetibilidade a infecção por parasitos, a produção de ROS também é importante para o balanço resistência/susceptibilidade às infecções, uma vez que pode causar danos ao DNA de parasitos induzindo-os a morte. Assim, avaliamos a produção, *in vitro*, destes radicais por macrófagos coincubados com as duas linhagens de bactérias de nosso interesse. Interessantemente, encontramos uma maior produção de ROS pelo grupo controle macrófagos (Grupo MØ+ZYM), quando comparadas com os grupos testes macrófagos coincubados com a linhagem T1 (Grupo MØ+T1) e macrófagos coincubados com a linhagem CP13 (Grupo MØ+CP13) (Figura 10). Assim, a inibição ou detoxificação da produção de ROS pode ser importante fator de virulência destas bactérias. Devido à

baixa produção de ROS dos macrófagos infectados linhagens T1 (selvagem) e CP13 (mutante derivada da selvagem), utilizamos a linhagem 1002, naturalmente atenuada, para observarmos se o quesito atenuação levaria a diferença na produção de ROS. Com isto, a linhagem de *C. pseudotuberculosis* 1002 (Grupo MØ+1002), apresentou uma maior produção de ROS, quando comparado com os grupos citados anteriormente, o que deve estar relacionado à sua baixa virulência (Figura 10).

Novamente, não encontramos diferença significativa para a produção de ROS quando comparamos as duas linhagens. Utilizamos como controle positivo, o estímulo com Zymosan (derivado de fungos).

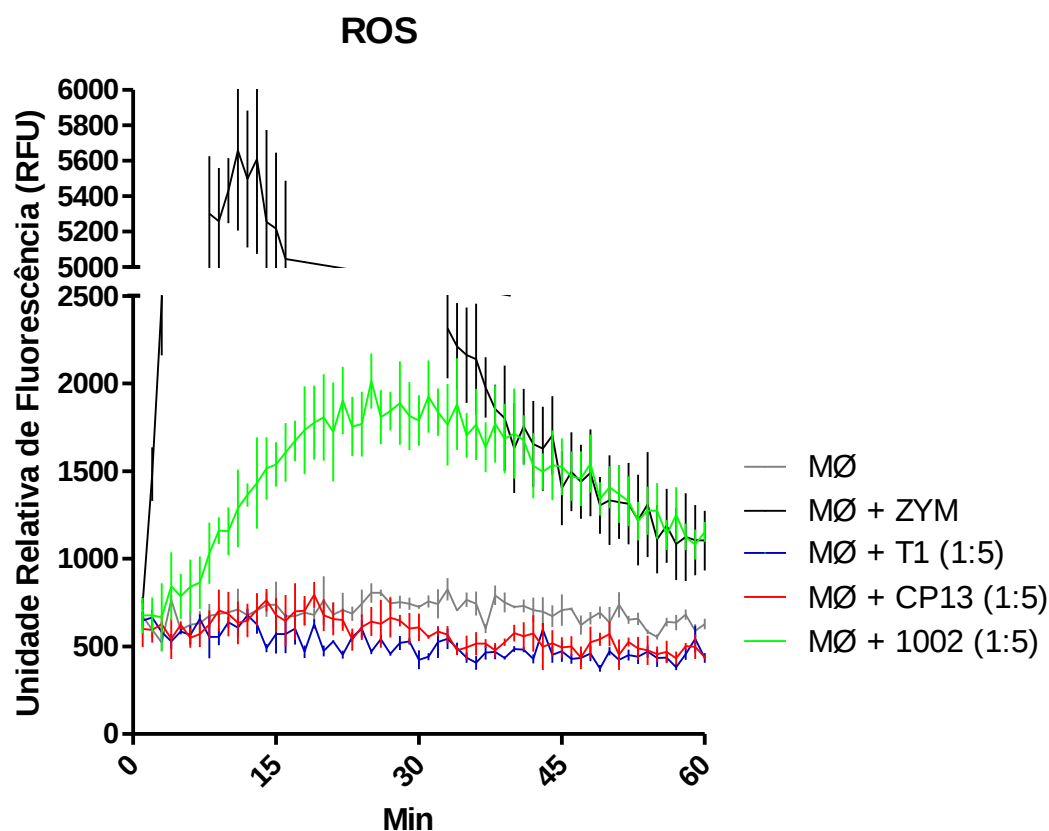


Figura 10 – Dosagem da produção de ROS. Cocultura de macrófagos com as linhagens CP13, T1 e 1002. O ensaio de mensuração da produção de ROS foi realizado duas vezes a cada minuto durante duas horas.

4.5 - Dosagem das Citocinas IL-10, TNF- α e TGF- β

A produção de citocinas pelos macrófagos pode ser importante para o perfil de ativação dos mesmos, além de serem relevantes para a indução de produção de NO e atividade de arginase. Assim, primeiramente, dosamos a citocina IL-10. Curiosamente, obtivemos variação estatisticamente significativa entre os grupos testes macrófagos coincubados com linhagem T1 (Grupo MØ+ T1) e macrófagos coincubados com linhagem CP13 (Grupo MØ+ CP13), onde houve maior produção de IL-10 por este último (Figura 11).

Vale ressaltar que esta citocina é importante para inibir a ativação clássica de macrófagos e pode estar relacionada como importante indutora da expressão de arginase I.

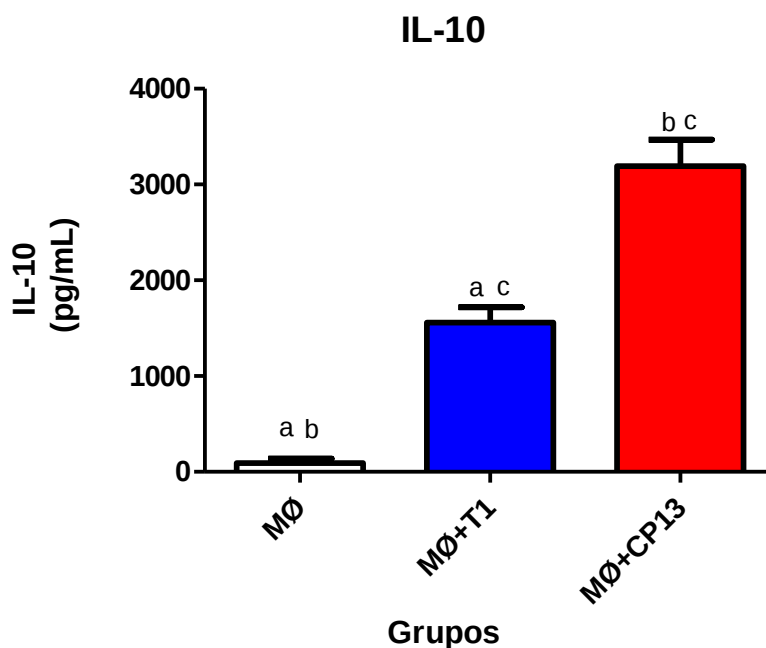


Figura 11 – Dosagem da produção da citocina IL-10. Cocultura de macrófagos com as linhagens de bactéria CP13 e T1. A dosagem da citocina foi feita através do teste de ELISA. Letras iguais entre barras diferentes significa variação estatística. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ -teste t de Student).

Por outro lado, quando dosamos a produção de TNF- α , importante citocina para indução de iNOS e ativação clássica de macrófagos, observamos uma variação estatisticamente significativa entre os grupos testes macrófagos coincubados com linhagem CP13 (Grupo MØ+ CP13) e macrófagos coincubados com linhagem T1 (Grupo MØ+ T1), onde houve maior produção de TNF- α por este último. (Figura 12).

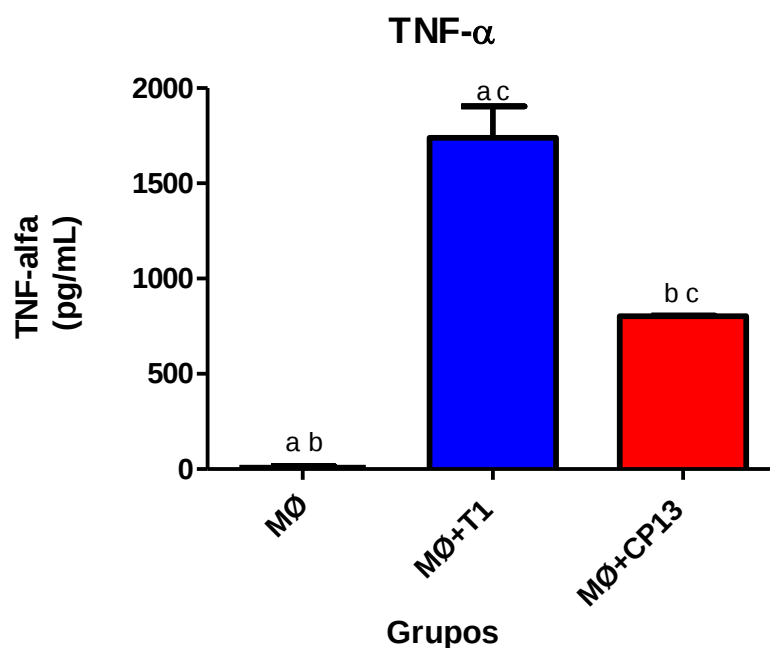


Figura 12 – Dosagem da produção da citocina TNF- α . Cocultura de macrófagos com as linhagens de bactéria CP13 e T1. A dosagem da citocina foi feita através do teste de ELISA. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste t de Student).

Para dosagem da citocina TGF- β , importante citocina com perfil regulatório, observou-se um aumento da produção no grupo macrófagos coincubados com linhagem CP13 (Grupo MØ+ CP13), quando comparado com o grupo macrófagos coincubados com linhagem T1 (Grupo MØ+ T1). Entretanto, este aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 13).

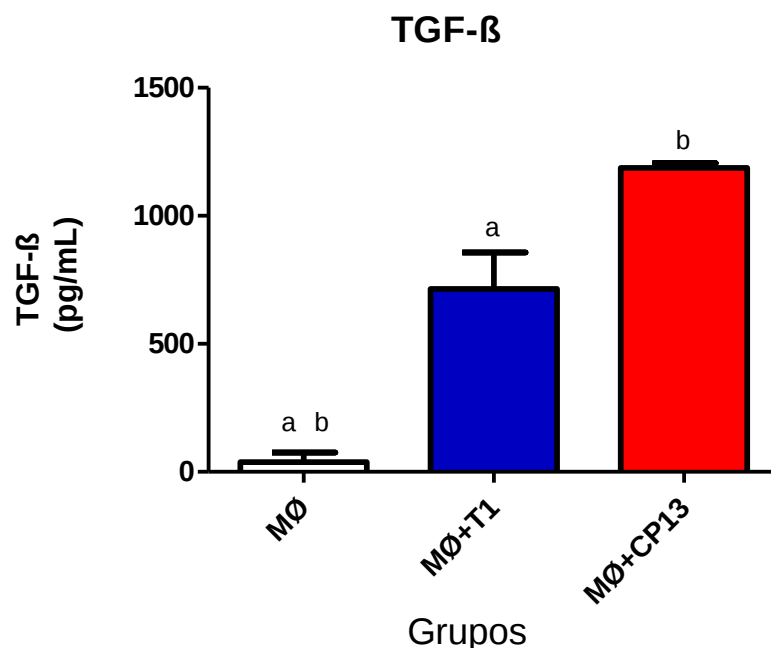


Figura 13 – Dosagem da produção da citocina TGF- β . Cocultura de macrófagos com as linhagens de bactéria CP13 e T1. A dosagem da citocina foi feita através do teste de ELISA. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste t de Student).

4.6 - qPCR

4.6.1 - Mensuração da expressão relativa do gene codificante da enzima Inducible Oxide Nitric Synthase (iNOS)

Com o objetivo de correlacionar os dados obtidos em relação à produção de NO com a expressão relativa do gene da enzima iNOS, analisamos a expressão do gene desta enzima por qPCR.

Encontramos variação estatisticamente significativa nos grupos teste macrófagos coincubados com linhagem CP13 previamente ativados com IFN- γ (MØ+ CP13 1:5+IFN) e macrófago coincubados com linhagem T1 previamente ativados com IFN- γ (MØ+ T1 1:5+IFN) onde houve aumento de aproximadamente 124X e 112X na expressão do gene da enzima iNOS, respectivamente, em relação ao controle macrófago

sem coincubação com bactérias (MØ) (Figura 14). Entretanto, não encontramos diferença significativa entre os grupos experimentais.

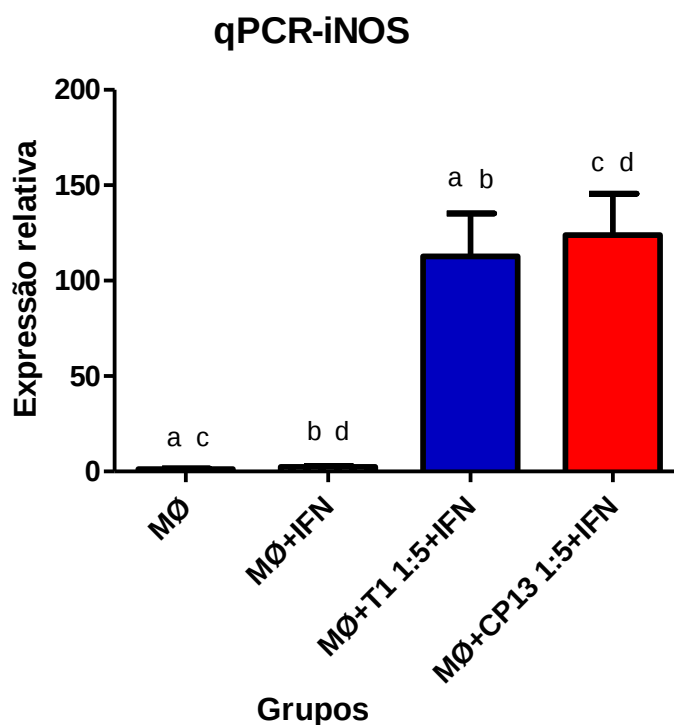


Figura 14 – Mensuração da expressão relativa do gene da enzima Inducible Oxide Nitric Synthase (iNOS) (MOI 1:5). Expressão do gene da enzima iNOS nos grupos MØ+ T1 1:5+IFN e MØ+ CP13 1:5+IFN, após 24 horas de infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

4.6.2 - Mensuração da expressão relativa do gene da enzima arginase I

Uma vez que o ensaio de atividade de arginase não discrimina entre as isoformas do tipo I e II, esta última não sendo imunomodulada, verificamos a expressão específica do gene da enzima arginase I pelos macrófagos.

Assim, encontramos variação estatisticamente significativa no grupo teste macrófagos coincubados com linhagem CP13 (Grupo MØ+ CP13 1:5), onde houve um aumento da expressão de aproximadamente 90X em relação ao controle macrófago (MØ). Também observamos uma variação estatisticamente significava no grupo controle (positivo). Macrófago suplementado com IL-4 (MØ+IL4), onde houve

aumento de aproximadamente 28x na expressão do gene da enzima Arginase I em relação ao controle macrófagos (MØ) (Figura 15). Além disso, uma redução estatisticamente significava entre os grupos macrófagos coincubados com linhagem T1 (Grupo MØ+ T1 1:5) quando comparado com o grupo MØ+ CP13 1:5 foi observada (Figura 15).

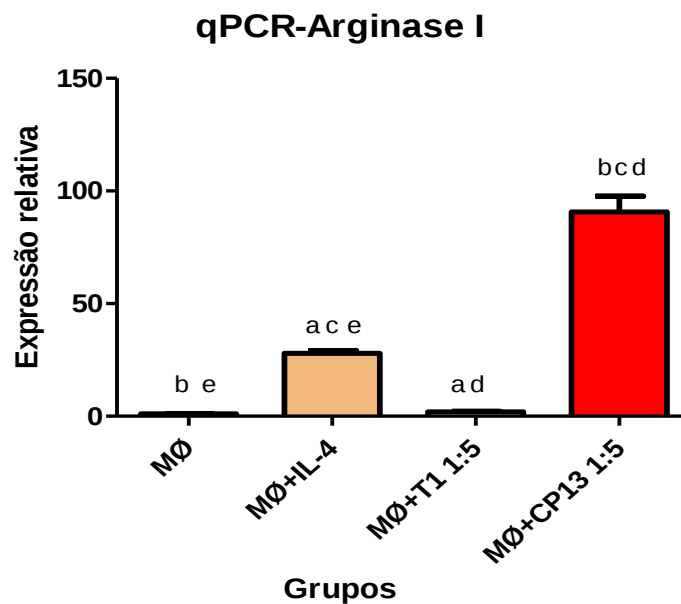


Figura 15 – Mensuração da expressão relativa do gene da enzima arginase I (MOI 1:5). Expressão do gene da enzima arginase I nos grupos MØ+IL-4, MØ+ T1 1:5 e MØ+ CP13 1:5, após 24 horas de infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

4.6.3 - Mensuração da expressão relativa do gene do transportador Cationic Amino Acid Transporter (CAT2B)

Visando melhor entendimento da forma como a infecção dos macrófagos pelas duas linhagens de bactérias interfere no metabolismo de L-arginina, medimos a expressão relativa do gene do transportador de membrana deste aminoácido (CAT2B), importante para o metabolismo tanto de iNOS como da arginase I, uma vez que garante o suplemento de substrato no interior da célula.

Encontramos uma variação estatisticamente significativa para os grupos teste macrófagos coincubados com linhagem T1 (Grupo MØ+ T1 1:5) e macrófago coincubados com linhagem CP13 (Grupo MØ+ CP13 1:5), onde houve aumento de aproximadamente 11x e 16x, respectivamente, da expressão deste gene em relação ao mesmo no grupo controle macrófagos (MØ). Houve também uma maior expressão do gene do transportador CAT2B no grupo MØ+ CP13 1:5, quando comparado com o grupo MØ+ T1 1:5 (Figura 16).

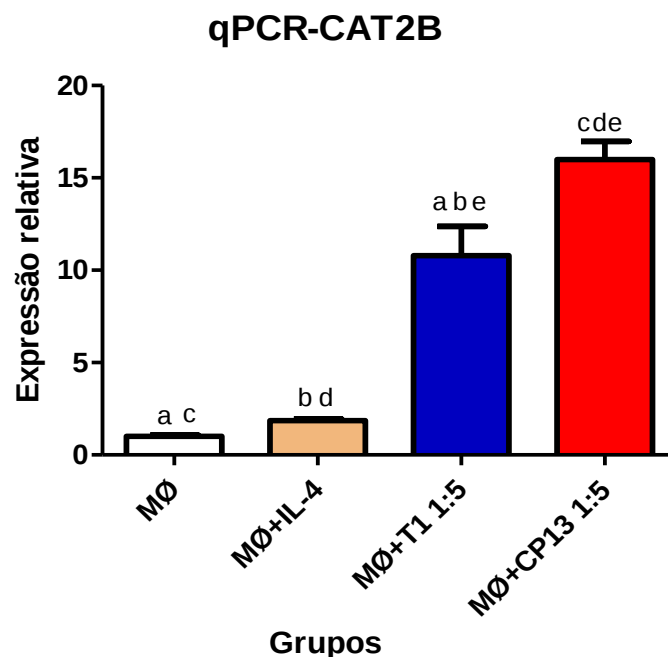


Figura 16 – Mensuração da expressão relativa do gene do transportador CAT2B, (MOI 1:5), para os mesmos grupos da mensuração da expressão relativa do gene da enzima arginase I. Expressão do gene do transportador CAT2B nos grupos MØ+IL-4, MØ+ T1 1:5 e MØ+ CP13 1:5, após 24 horas de infecção *in vitro*. Letras iguais entre barras diferentes significa variação estatística. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

Também analisamos a expressão relativa do gene do transportador de membrana de arginina (CAT2B) dos macrófagos, para as mesmas condições da mensuração da expressão do gene da enzima iNOS. Observamos que houve variação estatisticamente significativa nos grupos teste macrófagos coincubados com linhagem T1, previamente ativados com IFN- γ (Grupo MØ+ T1 1:5+IFN) e macrófagos coincubados com linhagem CP13, previamente ativados com IFN- γ (MØ+ CP13 1:5+IFN), onde houve aumento de aproximadamente 20x e 29x, respectivamente, da expressão deste gene em relação ao grupo controle macrófagos (MØ) (Figura 17).

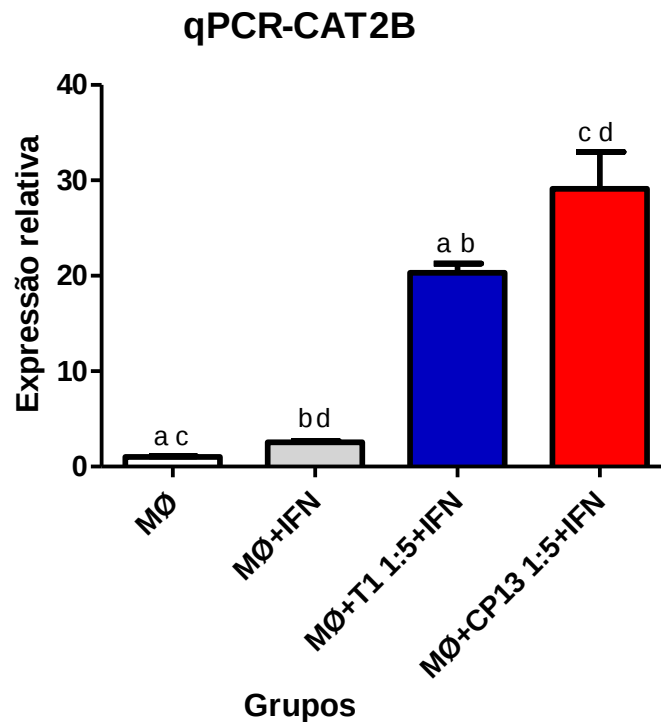


Figura 17 – Mensuração da expressão relativa do gene do transportador CAT2B, (MOI 1:5), para os mesmos grupos da mensuração da expressão relativa do gene da enzima iNOS. Expressão do gene do transportador CAT2B nos grupos MØ+IFN, MØ+ T1 1:5+IFN e MØ+ CP13 1:5+IFN, após 24 horas de infecção *in vitro*. Letras iguais entre colunas diferentes significa variação estatística ($p < 0,05$ - teste *t* de Student).

5 – Discussão

Os macrófagos contribuem de forma significativa para a defesa do organismo. De acordo com o estímulo (pró-inflamatório, metabólico ou imune), os macrófagos são recrutados das regiões periféricas para o sítio de injúria, onde contribuem para a defesa, remodelamento e reparo do tecido (Gordon & Taylor, 2005). A participação dos macrófagos contra a infecção por *C. pseudotuberculosis* é de grande importância, uma vez que estas células são umas das primeiras linhas de defesa gerada pelo hospedeiro contra este patógeno (Hard, 1969). Visto que não há relatos na literatura de como os macrófagos respondem à infecção contra esta bactéria, a proposta deste trabalho, de analisar o perfil de respostas dos macrófagos frente à infecção por *C. pseudotuberculosis*, torna-se crucial e pioneira para o entendimento do mecanismo de defesa gerado pelo hospedeiro.

O teste MTT, já vem sendo utilizado desde a década de 80, em vários trabalhos para dosagem da viabilidade celular de células infectadas com diferentes patógenos ou em contato com outros materiais, além de medir a proliferação celular (Albrecht *et al.*, 1989; Ladel *et al.*, 1997). Observando os resultados apresentados na Figura 2 e 3, notamos que o MOI influenciou na viabilidade das células, sendo que o aumento da concentração das bactérias levou à diminuição da viabilidade celular. Estudos usando nanopartículas poliaquil cianoacrilato, para dosar a viabilidade em cultura de macrófagos por MTT, mostrou que com o aumento da concentração destas nanopartículas as culturas de células perdiam viabilidade (Cruz *et al.*, 1997). Outro estudo usando o teste MTT, analisando a viabilidade de culturas de macrófagos linhagem J774.1, em infecções com a bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, causadora de doenças periodontais, mostrou aumento da citotoxicidade e menor viabilidade celular com o aumento do MOI. Ainda, neste estudo com *A. actinomycetemcomitans*, foi mostrado que esta citotoxicidade estava relacionada à indução de apoptose das células macrófagicas (Kato *et al.*, 1995). Talvez, a redução da viabilidade celular, encontrada nos macrófagos infectados por *C. pseudotuberculosis* neste trabalho, possa estar relacionada a algum mecanismo de ativação de apoptose nos macrófagos que são gerados por esta bactéria. Entretanto, em estudos com *Mycobacterium tuberculosis*, um organismo correlato a *C. pseudotuberculosis*, mostrou-se que linhagens selvagens desta bactéria apresentavam um resultado oposto ao encontrado neste trabalho. Elas impediam a apoptose das células, um mecanismo efetivo para eliminação destes patógenos. Foi mostrado que um mutante de *M. tuberculosis* para uma proteína serina-treonina-quinase, proteína responsável por evitar

a sinalização da apoptose nas células hospedeiras, apresentavam culturas com menor viabilidade celular quando comparado com infecções com uma linhagem selvagem (Jayakumar *et al.*, 2008). Com isto, o mecanismo de diminuição, com aumento do MOI, da viabilidade celular das culturas de macrófagos infectadas com *C. pseudotuberculosis*, deve estar mais relacionado à ação de fatores de virulência, como os lipídeos de membranas, que levam a lise celular (Jolly, 1966).

O mecanismo pelo qual a *C. pseudotuberculosis* evade e sobrevive ao sistema de defesa do hospedeiro ainda não é bem compreendido e isto se torna um empecilho para o entendimento dos mecanismos de defesa contra estas bactérias (Dorella *et al.*, 2006). Células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, exercem um papel importante na apresentação de primeiros sinais ou mediadores para a formação de uma resposta imune, além de serem umas das primeiras células a entrar em contato com *C. pseudotuberculosis* (Hard, 1972; Aderem & Ulevitch, 2000). Assim, produtos microbianos são responsáveis por ativar, em macrófagos, uma competência microbicida, levando a uma efetiva resposta imune. Esta competência está relacionada à ativação de um perfil clássico de ativação, sendo que a resposta mais comum é a ativação de genes envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias e a subsequente ativação da enzima iNOS, que é responsável pela produção de NO com ação microbicida, sendo que o NO pode inibir reversivelmente a replicação bacteriana, inibir a respiração bacteriana entre outras funções (Fang, 2004; Benoit *et al.*, 2008).

No presente trabalho, foi possível uma correlação entre indução da produção de NO e a atividade da enzima arginase I, onde se pode identificar uma relação inversamente proporcional para as culturas de macrófagos estimuladas com ambas às linhagens T1 e CP13, quando variou o MOI de 1:1 para 1:5 (Figura 6 e Figura 9). Para o MOI 1:1, observamos uma maior produção de radicais intermediários de nitrogênio (RNI) e uma menor atividade da enzima arginase I, mostrando que em infecções, *in vitro*, de baixa proporção, é encontrada uma tendência ao perfil clássico de ativação devido à maior produção de NO. Quando se aumenta a proporção da infecção (MOI 1:5), observamos a inversão deste perfil de resposta, sendo que há o aumento da atividade da enzima arginase I e diminuição da produção de NO, fazendo com que o perfil dessas culturas de macrófagos se aproxime mais do perfil de ativação alternativa, perfil característico de susceptibilidade a infecções. Vários patógenos têm desenvolvido estratégias para interferir na ativação dos macrófagos e modular a resposta do hospedeiro. Muitos trabalhos relatam que o perfil de ativação alternativa dos

macrófagos em contrapartida à ativação do perfil clássico propiciam uma maior susceptibilidade a infecções microbianas (Mills, 2001; Mosser & Edwards, 2008; Benoit *et.al.*, 2008). Trabalhos como o de Kropf *et. al.*,(2005), comprovam uma relação entre a atividade da enzima arginase I e a persistência de infecções. Ele mostrou que o uso de inibidores desta enzima em cultura de macrófagos de medula, coincubados com *Leishmania major*, e em camundongos infectados por este protozoário, tinham, respectivamente, menor proliferação do parasito e menor carga parasitária no sítio de infecção em camundongos. Outro trabalho, sobre uma via alternativa de ativação da enzima arginase I, envolvendo o micro-organismo *Mycobacterium bovis*, mostrou que a produção de NO, após infecção com esta bactéria, em macrófagos *knockout* para o gene da arginase I produziam mais NO que macrófagos sem a mutação. Com isto, eles sugeriram que a ativação da arginase I era um mecanismo que restringia a produção de NO. Além disto, neste mesmo trabalho, eles mostraram que camundongos *knockout* para o gene da arginase I, infectados por via aérea, apresentavam uma contagem menor de bactérias no pulmão, comparados com camundongos selvagens (Kasmi *et. al.*, 2008). De acordo com estes resultados encontrados na literatura, podemos inferir que a redução da produção de NO, com o aumento do MOI e subsequente aumento da atividade da enzima arginase I, pode estar relacionado a algum mecanismo de escape desta bactéria. Pelo aumento da atividade da enzima arginase I, podemos inferir que este mecanismos deve estar relacionado ao desvio da rota de catabolismo da L-arginina, onde esta via está direcionada a via da ornitina. Este possível mecanismo pode também estar relacionado à persistência das infecções, uma vez que o perfil de ativação alternativa, em infecções por outros organismos, está relacionado à persistência à infecções (Gordon *et al.*, 2003).

A produção de ROS é dada pela ação da NADPH phagocito oxidase (também conhecida como phox). Este complexo enzimático é responsável pela produção de superóxido (O_2^-) (Fang, 2004). Entre as funções do ROS, destacamos a sua função microbicida, uma vez que eles atacam DNA, proteínas e lipídeos de patógenos (Shohet *et al.*,1974; Imlay & Linn, 1986; Tamarit *et al.*, 1998). Nos resultados obtidos sobre a mensuração do ROS, por macrófagos infectados por *C. pseudotuberculosis*, (Figura 10), observamos que houve uma redução da produção de ROS pelos grupos testes macrófagos coincubados com linhagem selvagem T1 (Grupo MØ+T1) e macrófagos coincubados com linhagem mutante CP13 (Grupo MØ+CP13), quando comparado com o grupo controle macrófagos (MØ). Observamos também que a

linhagem 1002, atenuada, foi a única capaz de induzir aumento de ROS pelos macrófagos, diferente da linhagem selvagem T1 e do seu mutante CP13. Isto pode estar relacionado a algum mecanismo de regulação e escape da produção de ROS por estas linhagens, uma vez que é relatado na literatura que a *Corynebacterium pseudotuberculosis* é catalase positiva (Songer *et al.*, 1988; Dorella *et al.*, 2006). Na literatura, muitos mecanismos, envolvendo escape do patógeno a receptores celulares e quebra do padrão de sinalização em células fagocíticas e detoxificação de ROS e RNS (Espécies Reativas de Nitrogênio) estão envolvidos na inibição ou diminuição da produção de ROS (Rosqvist *et al.*, 1991; Celli & Finlay, 2002). Estudos com mutantes, para uma ilha de patogenicidade da *Salmonella typhimurium*, mostraram que estas bactérias podem interferir na distribuição das subunidades da NADPH oxidase, sendo que os fagossomos, nos mutantes para genes nesta ilha, possuíam maior recrutamento da enzima e produção de ROS nestes vacúolos quando comparado com os selvagens (Vazquez-Torres *et al.*, 2000). Outro exemplo de inibição da produção de ROS foi observado em estudos com a bactéria *Bordetella pertussis*. Esta bactéria é responsável por produzir uma toxina adenilato-ciclase, a qual, em testes realizados em monócitos incubados com efetores da produção de ROS, inibiu até 92% da produção de ROS por estes efetores (Pearson *et al.*, 1987). A detoxificação de ROS e RNS pela enzima catalase já é bem caracterizado na literatura, uma vez que esta enzima é definida como fator de virulência de várias bactérias e sua função é essencial para a resistência ao estresse oxidativo (Bishai *et al.*, 1994; Zeller & Klug, 2004, Wang *et al.*, 2004). De acordo com estes resultados, podemos inferir que através de um mecanismo, ainda desconhecido, as linhagens T1 (selvagem) e CP13 (mutante da selvagem), podem estabelecer uma infecção de forma a burlar a ativação da enzima NADPH fagócito oxidase.

Trabalhos relatando dosagem de produção de citocinas, em modelos *in vitro* e *in vivo*, estimuladas por linhagens selvagens e mutantes de *C. pseudotuberculosis* já vem sendo descritos desde a década de 90 (Ellis *et al.*, 1995; Pépin *et al.*, 1997; Lan *et al.*, 1999). No presente trabalho, observamos uma maior produção da citocina IL-10, pela linhagem CP13 quando comparada com a linhagem selvagem T1 e uma maior produção da citocina TNF- α pela linhagem T1, quando comparada com a mutante vacinal CP13 (Figura 11 e 12). Obtivemos também o aumento, mas não significativo, da produção da citocina TGF- β , pela linhagem mutante CP13, quando comparado com a linhagem selvagem T1 (Figura 13). A produção de

TNF- α , na literatura, está relacionada à indução de uma efetividade microbicida em macrófagos. Em um trabalho usando macrófagos humanos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, mostrou-se que a adição da citocina TNF- α era responsável por diminuir a intensidade da infecção em culturas destes macrófagos, devido a sua capacidade de induzir produção de receptor 2 de IFN- α (Robinson *et al.*, 2012). O trabalho realizado por Lan *et al.*, (1999) mostrou que a produção de TNF- α , em uma segunda infecção por *C. pseudotuberculosis*, era fundamental para o aumento da sobrevivência de camundongos infectados. Entretanto, em infecções de bactérias do gênero *Corynebacterium* em ovelhas adultas, mostrou que a produção de TNF- α está envolvida no desenvolvimento de infecções crônicas e caquexia, conhecida como síndrome da ovelha fina (Ellis *et al.*, 1995). Além disto, esta citocina quando produzida em excesso é um dos principais fatores estimuladores do choque séptico, causando injúria no tecido, hipertensão e levando à falha de vários órgãos em ratos (Tracey *et al.*, 1986). Em casos de infecção por *Corynebacterium parvum*, morta por calor, ou LPS em camundongos *knockout* para TNF- α , houve um ligeiro aumento da resistência ao efeito tóxico do LPS e da bactéria morta no processo inicial da infecção, quando comparado com camundongos selvagens. (Marino *et al.*, 1995). Isto se deve talvez à diminuição da amplificação do choque séptico. A produção de IL-10 e TGF- β , duas citocinas anti-inflamatórias, pode reduzir a ação de citocinas pro-inflamatórias, e entre elas o TNF- α (Espevik *et al.*, 1987; Ranges *et al.*, 1987; Malefyt-<http://www.cytokineresearch.org/index.html>). De forma interessante, embora a linhagem T1 induza maior produção de TNF- α que a linhagem CP13, e o contrário ocorra em relação à produção de IL-10, não encontramos diferença na produção de NO entre os grupos. Assim, embora apresente uma tendência à maior produção de citocinas regulatórias, os macrófagos co-incubados com a linhagem CP13 mantêm a capacidade de produzir NO, importante molécula microbicida. Neste contexto, através de alguma imunomodulação, a linhagem CP13 está induzindo a produção de IL-10, como observado no trabalho de Pinho *et al.* (2009), onde o uso de uma proteína recombinante de *C. pseudotuberculosis* como vacina, induziu a produção de IL-10 em camundongos Balb/c. Extrapolando para a condição *in vivo*, onde a linhagem CP13 é uma candidata a vacina, isto poderia levar à diminuição da ação do TNF- α , fazendo com que animais infectados não desenvolvam um quadro débil de caquexia ou talvez de choque séptico, levando assim, um aumento da sobrevivência destes. Então, se a patologia da bactéria estiver relacionada a uma ativação descontrolada do sistema imune (que pode levar o

indivíduo a morte), o fato de a linhagem mutante conseguir induzir TNF- α e NO, e ainda assim, IL-10 e TGF- β pode significar uma resposta imune mais equilibrada, onde a linhagem CP13 tem os mecanismos efetores para a eliminação do parasito, mas também induz a regulação da resposta.

Estudos usando o PCR em tempo real, para mensurar a expressão de genes relacionados à resposta dos macrófagos a estímulos microbianos, já vem sendo empregados em diversos trabalhos e mostram o aumento da expressão dos genes da enzima iNOS e arginase I (Kasmi *et al.*, 2008; Qualls *et al.*, 2010). Nos resultados obtidos neste trabalho (Figura 14 e 15), observamos um aumento da expressão dos genes da enzima arginase I e iNOS dos macrófagos, mensurados através do qPCR, junto com o aumento, nos ensaios bioquímicos, da atividade da enzima arginase I (exceto para o grupo MØ+ T1 1:5) e produção de NO. Estudos como o de Kahnert *et al.*, (2006), mostrou resultados similares, onde macrófagos murinos de medula sob infecções com *M. tuberculosis*, apresentavam expressão dos genes da enzima iNOS e arginase I, sob ação ou não de IFN- γ e IL-4. Além disto, ele mostrou que havia diminuição da produção de nitrito em macrófagos ativados por IL-4 e infectados ou somente infectados com *M. tuberculosis*, talvez por uma indução de ativação de um perfil alternativo nos macrófagos. Em um experimento realizado por Speranza *et al.*, (2010), utilizando RNA extraídos de baço de camundongos Balb/c, infectados por uma linhagem recombinante de *Mycobacterium bovis*, mostrou através do qPCR, que houve um aumento da expressão do RNAm da arginase I. Estes estudos corroboram com os resultados apresentados nesta dissertação, uma vez que uma bactéria correlata à *C. pseudotuberculosis*, também é capaz de induzir a expressão dos genes da enzima iNOS e arginase I. Além disto, em artigos como o de Kasmi *et al.*, (2008), foi observado que o aumento da expressão dos RNAm da iNOS e arginase I, era correlatado com a produção de nitrito e da atividade da enzima arginase I. Através destes resultados, podemos inferir que o aumento da expressão dos RNAm para estas enzimas é seguido de um aumento biológico para estas. Também podemos observar que não há diferença de expressão de iNOS, apesar de T1 induzir mais TNF- α que CP13, o que justifica uma boa produção de NO para os grupos. Além disso, houve um aumento muito maior de expressão do gene da enzima arginase I na linhagem CP13, o que pode estar relacionado com o perfil de produção mais regulatório de IL-10, induzida pela linhagem CP13. Um trabalho similar, mostrando a regulação da resposta inflamatória, é relatado no trabalho de Cao *et al.* (2012), onde a coincubação de macrófagos produzindo IL-10/TGF- β com macrófagos

ativados de forma clássica, induziu diminuição de produção e expressão de TNF- α e iNOS por outros macrófagos, além de levar ao aumento da expressão da enzima arginase I nos macrófagos clássicos. Este processo diminuiu, também, um tipo de inflamação renal em camundongos, quando os macrófagos produzindo IL-10/ TGF- β foram inoculados nestes camundongos. Comparado estes resultados com o desta dissertação, podemos inferir que a produção de citocinas anti-inflamatórias, induzidas pela linhagem CP13, pode levar a uma regulação da resposta, diminuindo os efeitos danosos do perfil clássico de ativação dos macrófagos.

Estudos feito por Yeramian *et al.*, (2006a), mostraram que macrófagos de medulas *knockout* para o gene *Slc7A2*, responsável por codificar o transportador CAT-2B, diminuía a produção de NO e produtos catalisados pela arginase I. Isto mostrou que a disponibilidade de L-arginina é um fator responsável pela polarização das respostas nos macrófagos e é dependente deste transportador. Também, neste mesmo trabalho, foi demonstrado por qPCR que a expressão do gene *Slc7A2* não é afetada pela atividade da enzima arginase I ou a ação da enzima iNOS. Entretanto, no trabalho de Wanasen *et al.* (2007), foi observado que IFN- γ aumentava a expressão do transportador CAT-2B, suprarregulando a captação de L-arginina do meio. Isto levou ao aumento da sobrevivência de amastigotas de *Leishmania amazonensis* em macrófagos. Os resultados encontrados neste trabalho de dissertação mostraram um aumento da expressão do gene desse transportador, o CAT-2B, em ambos os estímulos usados para dosar a expressão do RNAm da enzima arginase I e da iNOS nos testes de infecção dos macrófagos. Entretanto, os macrófagos estimulados com a linhagem CP13 foram mais hábeis em expressar o RNAm para o transportador (Figuras 16 e 17). Isto mostrou uma congruência entre os resultados do qPCR para a enzima iNOS e arginase I, uma vez que também houve aumento na expressão delas (Figuras 14 e 15). De acordo com o trabalho de Yeramian *et al.*, (2006b), citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-10, além de moléculas como o LPS, podem ativar a expressão deste transportador, o que nos leva a inferir que *C. pseudotuberculosis*, linhagem CP13, pela alta produção de IL-10, de alguma forma foi responsável por ativar a expressão do RNAm deste transportador o que permitiu uma grande disponibilidade de L-arginina para a produção de NO, mesmo com o desvio para a via da ornitina, levando ainda assim à uma efetividade microbicida.

6 – Conclusão

A realização deste trabalho permitiu identificar e caracterizar *in vitro*, em parte, o perfil de ativação de macrófagos, importante componente da resposta imune inata, que a *C. pseudotuberculosis* CP13 induz no hospedeiro; mostrando que há pouca diferença em os macrófagos respondem à linhagem selvagem T1 e mutante CP13. A principal diferença entre as duas foi a indução do perfil diferente de citocinas, sendo que CP13, levou a maior produção da citocina IL-10. Isto sugere que o mecanismo pela qual a linhagem CP13 induz uma efetiva resposta imune no hospedeiro, após desafios, deve esta relacionada a algum mecanismo, talvez induzindo uma forte resposta imune com boa produção de fatores microbicidas, como NO e o TNF- α , além de produzir uma resposta imunomodulada, com boa produção de citocinas anti-inflamatórias. Então, considerando os resultados deste trabalho, é importante que sejam realizados trabalhos complementares para um total entendimento de como esta linhagem vacinal protege o hospedeiro, uma vez que, a partir deste entendimento, será possível elucidar novas estratégias de proteção contra a *C. pseudotuberculosis*.

7 - Perspectivas

Testar *in vivo* o perfil de produção de citocinas e imunoglobulinas em camundongos imunizados com a linhagem mutante CP13 e desafiados com linhagem selvagem MIC6, altamente virulenta e T1 de *C. pseudotuberculosis*. Este experimento proposto proporcionará uma complementação do perfil de resposta imunológica *in vitro*, uma vez que a resposta *in vivo* leva em conta outras variáveis.

8 – Referências

1. Aderem, A. & Ulevitch, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, vol 406 – 17 august 2000.
2. Airello, S.; Mays, A.; Oliveira, P. M. A. Manual Merck de Veterinária. Editora Roca, São Paulo, 8ªed. 2001.
3. Alves, F.S.F.; Pinheiro, R.R.; Pires, P.C. Linfadenite caseosa: patogenia diagnóstico controle, Artigo Técnico. Documento nº 27, Embrapa Sobral CE, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1997.
4. Arsenault, J.; Girard, C.; Dubreuil, P.; Daignault, D.; Galarneau, J.-R.; Boisclair, J.; Simard, C.; Bélanger, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, *Prev. Vet. Med.* 59 67–81. 2003
5. Augustine, J. L.; Renshaw, H. W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites, *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 713–715. 1986
6. Ayers, J.L. Caseous lymphadenitis in goats and sheep: a review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171, 1251–1254. 1997
7. Bayan, N.; Houssin, C.; Chami, M.; Leblon, G. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications, *J. Biotechnol.* 104 55–56. 2003.
8. Benoit, M.; Barbarat, B.; Bernard, A.; Olive, D.; Mege, J-L. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 38: 1065–1070. 2008
9. Biberstein, E. L.; Knight, H. D. & Jang, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet Rec* 89, 691–692. 1971.
10. Billington, S. J.; Esmay, P. A.; Songer, J. G.; Jost, B. H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 41-45. 2002.
11. Binns, S. H.; Green, L. E.; Bailey, M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.* 123, 169–179. 2007.
12. Bishai, W. R.; Howard, N. S.; Winkelstein, J. A.; Smith, H. O. Characterization and Virulence Analysis of Catalase Mutants of *Haemophilus influenza*. *INFECTION AND IMMUNITY*, P. 4855-4860, Nov. 1994.
13. Bogdan, J. R.; Newlands-Monteith, C. F.; Ellis, J. A. Nitric oxide production following *in vitro* stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 56, p. 299-310. 1997.

14. Brandt, E.; Woerly, G.; Younes, A. B.; Loiseau, S.; Capron, M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 68, 125–130. 2000.
15. Burrel, D. H. A. haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Res. Vet. Sci.*, v. 28, p. 190-194, 1980
16. Celli, J. & Finlay, B. B. Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends Microbiol.* 10, 232–237. 2002.
17. Collins, M. D.; D. Jones and G. M. Schofield. Reclassification of '*Corynebacterium haemolyticum*' (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen.nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom.rev., comb.nov. *J. Gen. Microbiol.* 128:1279-1281. 1982.
18. Corraliza, I. M.; Campo, M. L.; Soler, G.; Modolell, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods* 174 231-235, 1994.
19. Costa, M. P.; McCulloch, J. A.; Almeida, S. S.; Dorella, F. A.; Fonseca, C. T.; Oliveira, D. M.; Texeira, M. F. S.; Laskowska, E.; Lipinska, B.; Meyer, R.; Portela, R. W.; Oliveira, S. C.; Miyoshi, A.; Azevedo, A. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* hsp60-hsp10 operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by hsp60 DNA vaccination in mice. *BMC Research Notes*, 4:243, 2011.
20. Cruz, T.; Gaspar, R.; Donato, A.; Lopes, C. Interaction Between Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles and Peritoneal Macrophages: MTT Metabolism, NBT Reduction, and Production. *Pharmaceutical Research*, Vol. 14 No. 1, 1997.
21. D' Afonseca, V.; Moraes, P. M.; Dorella, F. A.; Pacheco, L. G. C.; Meyer, R.; Portela, R. W.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular Research* 7 (1): 252-260, 2008.
22. Dale, D. C.; Boxer, L. & Liles, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112, 935–945, 2008.
23. Dercksen, D. P.; Brinkhof, J. M. A.; Dekker-Nooren, T.; van Maanen, K.; Bode, C. F.; Baird, G.; Kamp, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 75, 167–175, 2000.
24. Dorella, F. A. Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Tese de Doutorado – Departamento de Genética – ICB/UFMG, 2009.

25. Dorella, F. A.; Estevam, E. M.; Cardoso, P. G.; b, Savassi B. M.; Oliveira, S. C.; Azevedo, V.; Miyoshi, A. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 114 298–303, 2006c.
26. Dorella, F. A.; Estevam, E. M.; Pacheco, L. G. C.; Guimarães, C. T.; Lana, U. G. P.; Gomes, E. A.; Barsante, M. M.; Oliveira, S. C.; Meyer, R.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. In Vivo Insertional Mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an Efficient Means To Identify DNA Sequences Encoding Exported Proteins. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 7368–7372, Nov. 2006b.
27. Dorella, F. A.; Pacheco, L. G. C.; Seyffert, N.; Portela, R. W.; Meyer, R.; Miyoshi, A.; Azevedo, A. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 8(2), 205–213, 2009.
28. Dorella, F. A.; Pacheco, L. G.; Oliveira, S. C.; Myoshi, A.; Azevedo, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* 37 201–218, 2006a
29. Edwards, J. P.; Zhang, X.; Frauwirth, K. A.; Mosser, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1298–1307, 2006.
30. Ellis, J. A.; Campos, M.; Snyder, M.; Chelak, B.; Haines, D. M. Local Production of Tumor Necrosis Factor- α in Corynebacterial Pulmonary Lesions in Sheep. *Vet Pathol* 32:68-71, 1995.
31. Ellis, J. A.; Lairmore, M. D.; O'toole, D. T. Campos, M. Differential induction of tumor necrosis factor alpha in ovine pulmonary alveolar macrophages following infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Pasteurella haemolytica*, or lentiviruses. *Infect Immun.* 59(9):3254-60, 1991.
32. Espevik, T.; Figari, I. S.; Shalaby, M. R.; Lackides, G. A.; Lewis, G. D.; Shepard, H. M.; Palladino, M. A. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *JEM* vol. 166 no. 2 571-576 , 1987.
33. Fang, F. C. Antimicrobial Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Concepts And Controversies. *Nature Reviews*, Volume 2. October, 2004.
34. Fernández, E. P.; Vela, A. I.; Las Heras, A.; Domínguez, L.; Fernández-Garayzábal, J. F.; Moreno, M. A. Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis, *Int. J. Antimicrob. Agents* 18) 571–574, 2001.
35. Filipe-Santos, O.; Bustamante, J.; Chapgier, A.; Vogt, G.; de Beaucondrey, L.; Feinberg, J.; Jouanguy, E.; Boisson-Dupuis, S.; Fieschi, C.; Picard, C.; Casanova, J-L..

Inborn errors of IL-12/23- and IFN- γ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin. Immunol.* 18, 347–361, 2006.

36. Gibson, C. M.; Caparon, M. G. Alkaline Phosphatase Reporter Transposon for Identification of Genes Encoding Secreted Proteins in Gram-Positive Microorganisms. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 928–932, Feb. 2002
37. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.* 5, 953–964, 2005.
38. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Rev. Immunol.* 3, 23–35, 2003.
39. Gordon, S. The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37, S9–S17, 2007.
40. Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glogowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S. Tannenbaum, S. R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [^{15}N]Nitrate in Biological Fluids. *Analytical Biochemistry* 126, 131–138, 1982.
41. Guimarães, A. Sá.; Seyffert, N.; Gouveia, A. M. G.; Lage, P. A.; Portela, R. W. D.; Meyer, R.; Azevedo, V. A. C.; Carmo, F. B.; Cruz, J. C. M.; Heinemann, M. B. Linfadenite caseosa em rebanhos ovinos no estado de Minas Gerais, Brasil: Prevalência e informações de manejo. *Ciência Animal Brasileira – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria – Suplemento 1*, 2009
42. Hard G. C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*, *J. Med. Microbiol.* 5 483–491, 1972.
43. Hard, G. C. Immunity to experimental infection with *Corynebacterium ovis* in the mouse peritoneal cavity. *Res. Vet. Sci.* 10:547-554, 1969.
44. Harris, J.; De Haro, S. A.; Master, S. S.; Keane, J.; Roberts, E. A.; Delgado, M.; Deretic, V. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 27, 505–517, 2007.
45. Hodgson A.L.M.; Krywult J.; Corner L.A.; Rothel J.S.; Radford A.J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle, *Infect. Immun.* 60 2900–2905, 1992.
46. Hoffman, R. A.; Langrehr, J. M.; Billiar, T. R.; Curran, R. D.; and Simmons, R. L. Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine, *J. Immunol.*, 145, 2220, 1990.
47. Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. T. Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T.,

- Williams S.T. (Eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 593, 1994.
48. Hutchison, C. A.; Peterson, S. N.; Gill, S. R.; Cline, R. T.; White, O.; Fraser, C. M.; Smith, H. O. Venter, J. C. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* 286:2165–2169, 1999.
 49. Imlay, J. A. & Linn, S. Bimodal pattern of killing of DNA repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 166, 519–527, 1986.
 50. Jayakumar, D.; Jacobs, W. R.; Narayanan, S. Protein kinase E of *Mycobacterium tuberculosis* has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection. *Cellular Microbiology* 10(2), 365–374, 2008.
 51. Jolly R.D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*, *J. Appl. Bacteriol.* 29 189–196, 1966.
 52. Jones, T. C.; Hunt, R. D.; King, N. W. *Patologia Veterinária*. Ed. Manole, 6ª edição. 2000.
 53. Kahnert, A.; Seiler, P.; Stein, Maik.; Bandermann, S.; Hahnke, K.; Mollenkopf, H.; Kaufmann, S. H. E. Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 36: 631–647, 2006.
 54. Kasmi, K. C.; Qualls, J. E.; Pesce, J. T.; Smith, A. M.; Thompson, R. W.; Henao-Tamayo, M.; Basaraba, R. J.; König, T.; Schleicher, U.; Koo, M-S.; Kaplan, G.; Fitzgerald, K. A.; Tuomanen, E. I.; Orme, I. M.; Kanneganti, T-D.; Bogdan, C.; Wynn, A. T.; Murray, P. J. Toll-like receptor–induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nature Immunology* Volume 9, Number 12, December 2008.
 55. Kato, S.; Muro, M.; Akifusa, S.; Hanada, N.; Semba, I.; Fujii, T.; Kowashi, Y.; Nishihara, T. Evidence for Apoptosis of Murine Macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Infection. *Infection and Immunity*. p. 3914–3919, Oct. 1995
 56. Khamis, A.; Raoult, D. & La Scola, B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 42, 3925–3931, 2004.
 57. Kiderlen, A. F. & Kaye, P. M. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *Journal of Immunological Methods*, 127 11-18, 1990.
 58. Kim, B. J.; Lee, S. H.; Lyu, M. A.; Kim, S. J.; Bai, G. H.; Kim, S. J.; Chae, G. T.; Kim, E. C.; Cha, C. Y.; Kook, Y. H. Identification of *Mycobacterial* species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*), *J. Clin. Microbiol.* 37 1714–1720, 1999.

59. Kreider, T.; Anthony, R. M.; Urban, J. F. Jr.; Gause, W. C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 448–453, 2007.
60. Kropf, P.; Fuentes, J. M.; Fährlich, E.; Arpa, L.; Herath, S.; Weber, V.; Soler, G.; Celada, A.; Modolell, M.; Müller, I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *The FASEB Journal*, Vol. 19 June 2005.
61. Ladel, C. H.; Szalay, G.; Riedel, D.; Kaufmann, S. H. E. Interleukin-12 Secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Macrophages. *Infection And Immunity*, p. 1936–1938, May 1997
62. Lan, D. T .B.; Makino, S.; Shirahata, T.; Yamada M.; Nakane. A. Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon are Required for the Development of Protective Immunity to Secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Mice. *J. Vet. Med. Sci.* 61(11): 1203–1208, 1999.
63. Lan, D.T.B.; Taniguchi, S.; Makino, S.; Shirahata, T. Role of Endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* v. 42 n.12, p. 863-870, 1998.
64. Li, Hui.; Meininger, C. J.; JR, J. R. H.; Haynes, T. E.; Kepka-Lenhart, D.; Mistry, S. K.; Morris, M. S.; Wu, A. G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E75–E82, 2001.
65. Liu, D.T.; Chan, W.M.; Fan, D.S.; Lan, D.S. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Br. J. Ophthalmol.*, v. 89, p. 245–246, 2005.
66. Lyon, W.; Gibson, C. M.; Caparon, M. G. A role for trigger factor and an Rgg-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. *EMBO J.* 17:6263–6275, 1998.
67. Mackaness, G. B. Cellular immunity and the parasite. *Adv. Exp. Med. Biol.* 93, 65–73, 1977.
68. Malefyt, R. W. IL-10. <http://www.cytokineresearch.org/index.html>
69. Marino, M. W.; Dunn, A.; Grail, D.; Inglese, M.; Noguchi, Y.; Richards, E.; Jungbluth, A.; Wada, H.; Moore, M.; Williamson, B.; Basu, Sunanda.; Old, L. J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 94, pp. 8093–8098, July 1997.

70. McKean SC, Davies JK, Moore RJ. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43°C. *Res. Microbiol.* 158, 279–286, 2007.
71. Menzies, P. I.; Hwang T, -I.; Prescott, J. F. Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats, *Vet. Microbiol.* 100 129–137, 2004.
72. Merchant, I. A.; Packer, R. A. The Genus *Corynebacterium*, in: Merchant I.A., Packer R.A. (Eds.), *Veterinary bacteriology and virology*, The Iowa State University Press, Iowa, , pp. 425–440, 1967.
73. Mills, C. D. Macrophage Arginine Metabolism to Ornithine/Urea or Nitric Oxide/Citrulline: A Life or Death Issue. *Critical Reviews™ in Immunology*, 21(4):399–426, 2001.
74. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 55-63, 1983.
75. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews*, | volume 8. December 2008.
76. Moura-Costa, L. F.; Bahia, R. C.; Carminati, R.; Vale, V. I.; Paule, B. J.; Portela, R. W.; Freire, S. M.; Nascimento, I.; Schaer, R.; Barreto, L. M.; Meyer, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 15;126(1-2):131-41, 2008.
77. Muckle, C.A.; Gyles, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Can. J. Comp. Med.* 46 206–208, 1982.
78. Muckle, C. A.; Menzies, P. I.; Li Y.; Hwang, Y. T.; van Wesenbeeck, M. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Vet. Microbiol.* 30 47–58, 1992.
79. Muller, U.; Stenzel, W.; Köhler, G.; Werner, C.; Polte, T.; Hansen, G.; Schütze, N.; Straubinger, R. K.; Blessing, M.; McKenzie, A. N. Brombacher, F., Alber, G.. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 179, 5367–5377, 2007.
80. Nandan, D. & Reiner, N. E. Attenuation of γ interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect. Immun.* 63, 4495–4500, 1995.
81. Nathan, C. Mtchnikoff's legacy in 2008. *Nature Immunol.* **9**, 695–698, 2008.

82. O'Shea, J. J. & Murray, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28, 477–487, 2008.
83. Olson, M. E.; Ceri, H.; Morck, D. W.; Buret, A. G.; Read, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Can. J. Vet. Res.* 66 86–92, 2002.
84. Pacheco, L. G. C.; Pena, R. R.; Castro, T. L. P.; Dorella, F. A.; Bahia, R. C.; Carminati, R.; Frota, M. N. L.; Oliveira, S. C.; Meyer, R.; Alves, F. S. F.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. Multiplex PCR Assay for Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Pure Cultures and for Rapid Detection of this Pathogen in Clinical Samples. *J. Med. Microbiol.*, 2007.
85. Pai, R. K.; Convery, M.; Hamilton, T. A.; Boom, W. H.; Harding, C. V. Inhibition of IFN- γ -induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. *J. Immunol.* 171, 175–184, 2003.
86. Paton, M.W.; Rose, I.R.; Hart, R.A.; Sutherland, S.S.; Mercy, A.R.; Ellis, T.M.; Dhaliwal, J.A. Newinfection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. *Aust. Vet. J.* 71, 47–49, 1994.
87. Paton, M.W.; Walker, S.B.; Rose, I.R.; Watt, G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks, *Aust. Vet. J.* 81 91–95, 2003.
88. Paule, B. J. A.; Azevedo, V.; Regis, L. F.; Carminati, R.; Bahia, C. R.; Vale, V. L. C.; Moura-Costa, L. F.; Freire, S. M.; Nascimento, I.; Schaer, R.; Goes, A. M.; Meyer, R.. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96:129–139, 2003.
89. Pearson, R. D.; Symes, P.; Conboy, M.; Weiss, A. A.; Hewlett, E. L. Inhibition of onocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis*. *The Journal of Immunology* October 15, vol. 139 no. 8 2749-2754, 1987.
90. Peel, M. M.; Palmer, G. G.; Stacpoole, A. M.; Kerr, T. G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* 24, 185–191, 1997.
91. Pépin, M.; Pittet, J-C.; Olivier, M.; Gohint, I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *J. Leukocyte Biol.* 56, 666–670, 1994.
92. Pépin, M.; Seow, H. F.; Corner, L.; Rothel, J.S.; Hodgson, A.L.M.; Wood, P.R. Citokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet. Res.* 28:149-163, 1997.

93. Perez-Casal, J.; Caparon, M. G.; Scott, J. R. Mry, a *trans*-acting positive regulator of the M protein gene of *Streptococcus pyogenes* with similarity to the receptor proteins of two-component regulatory systems. *J. Bacteriol.* 173:2617–2624, 1991.
94. Pinho, J. M. R.; Dorella, F. A.; Coelho, K. S.; Fonseca, C. T.; Cardoso, F. C.; Meyer, R.; Portela, R. W. D.; Oliveira, S. C.; Miyoshi, A.; Azevedo, V. Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* heat-shock protein (Hsp)-60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. *The Open Veterinary Science Journal*, 3, 22-27, 2009,
95. Piontkowski, M. D.; Shivvers, D. W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212:1765-1768, 1998.
96. Ranges, G. E.; Figari, I. S.; Espevick, T.; Palladino, M. A. Inhibition of cytotoxic T cell development by Transforming Growth Factor β and reversal by recombinant Tumor Necrosis Factor α . *J. Exp. MED.* ©The Rockefeller University Press. Volume 166 991-998, October 1987.
97. Ribeiro, M. G.; Júnior, J. G. D.; Paes, A. C.; Barbosa, P. G.; Júnior, G. N.; Listoni, F. J. P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na LC caprina, *Arq. Inst. Biol.* 68: 23-28, 2001.
98. Ribeiro, O. C.; Silva, J. A. H.; Oliveira, S. C.; Meyer, R.; Fernandes, G. B. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. *Pesq. Agropec. Bras.* 26, 461–465, 1991.
99. Robinson, C. M.; Jung, J-Y.; Nau, G. J. Interferon- γ , tumor necrosis factor, and interleukin-18 cooperate to control growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Cytokine* 60 233–241, 2012.
100. Rosqvist, R.; Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* 4562–4569, 1991.
101. Shigidi, M. T. A. An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Res. Vet. Sci.* v.24, p. 57-60, 1978.
102. Shigidi, M. T. A. Antigenic relationship of various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bull. Epizootic Dis. Africa.* v.22, p. 263-269, 1974.
103. Shohet, S. B.; Pitt, J.; Baehner, R. L.; Poplack, D. G. Lipid peroxidation in the killing of phagocytized pneumococci. *Infect. Immun.* 10, 1321–1328, 1974.
104. Songer, J. G.; Beckenbach, K.; Marshall, M. M.; Olson, G. B. & Kelley, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am J Vet Res* 49, 223–226, 1988.

105. Speranza, V.; Colone, A.; Cicconi, R.; Palmieri, G.; Giovannini, D.; Grassi, M.; Mattei, M.; Sali, M.; Delogu, G.; Andreola, F.; Colizzi, V.; Mariani, F. Recombinant BCG-Rv1767 amount determines, in vivo, antigen-specific T cells location, frequency, and protective outcome. *Microbial Pathogenesis* 48, 150-159, 2010.
106. Stanford, K.; Brogden, K. A.; McClelland, L. A.; Kozub, G. C. Audibert F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.* 62, 38–43, 1998.
107. Sternberg, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Rev. Immunol.* 6, 318–328, 2006.
108. Tamarit, J.; Cabiscol, E. & Ros, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 273, 3027–3032, 1998.
109. Tracey, K. J.; Beutler, B.; Lowry, S. F.; Merryweather, J.; Wolpe, S.; Milsark, L. W.; Hariri, R. J.; Fahey III, T. J.; Zentella, A.; Albert, J. D.; Shires, G. T.; Cerami, A. Shock and Tissue Injury Induced by Recombinant Human Cachectin. *Science*, Vol. 234, October 1986.
110. Unanian, M. M., Feliciano Silva, A. E. D.; Pant, K. P. Abscesses and caseous lymphadenitis in goats in tropical semi-arid north-east Brazil. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 17, 57-62, 1985.
111. Vaneechoutte M.; Riegel P.; de Briel D.; Monteil H.; Verschraegen G.; De Rouck A.; Claeys G. Evaluation of applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*, *Res. Microbiol.* 146 633–641, 1995.
112. Vazquez-Torres, A.; Xu, Y.; Jones-Carson, J.; Holden, D. W.; Lucia, S. M.; Dinauer, M. C.; Mastroeni, P.; Fang, F. C. *Salmonella* Pathogenicity Island 2D-Dependent Evasion of the Phagocyte NADPH Oxidase. *Science* VOL 287, 3 March 2000.
113. Walker, J.; Jackson, H.; Brandon, M. R.; Meeusen, E. (1991) Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. *Clin. Exp. Immunol.* (86):13-18, 1991.
114. Wanasen, N.; MacLeod, C. L.; Ellies, L. G.; Soong, L. L-Arginine and Cationic Amino Acid Transporter 2B Regulate Growth and Survival of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Macrophages. *INFECTION AND IMMUNITY*, p. 2802–2810, June 2007.

115. Wang, G.; Conover, R. C.; Benoit, S.; Olczak, A.; Olson, J. W.; Johnson, M. K.; Maier, R. J. Role of a Bacterial Organic Hydroperoxide Detoxification System in Preventing Catalase Inactivation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 279, No. 50, Issue of December 10, pp. 51908–51914, 2004.
116. Williamson L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17 359–371, 2001.
117. Yeramian, A.; Martin, L.; Arpa, L.; Bertran, J.; Soler, C.; McLeod, C.; Modolell, M.; Palacín, M.; Lloberas, J.; Celada, A. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *Eur. J. Immunol.* 36: 1516–1526, 2006.
118. Yeramian, A.; Martin, L.; Serrat, N.; Arpa, L.; Soler, C.; Bertran, J.; McLeod, C.; Palacín, M.; Modolell, M.; Lloberas, J.; Celada, A. Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages. *J Immunol*; 176:5918-5924, 2006.
119. Yeruham I.; Friedman S.; Perl S.; Elad D.; Berkovich Y.; Kalgard Y. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd, *Vet. Dermatol.* 15 315–320, 2004.
120. Yeruham, I.; Braverman, Y.; Shpigel, N. Y.; Chizov-Ginzburg, A.; Saran, A.; Winkler, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. *I. Vet. Q.* 18:87-89, 1996.
121. Yozwiak, M. L.; Songer, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am J Vet Res.* 54(3):392-7, 1993.
122. Zeller, T.; Klug, G. Detoxification of hydrogen peroxide and expression of catalase genes in *Rhodobacter*. *Microbiology*, 150, 3451–3462, 2004.
123. Zhang, X. & Mosser, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J. Pathol.* 214, 161–178, 2008.