

DAYANA RIBEIRO

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA INFECÇÃO POR UMA LINHAGEM  
ATENUADA DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAMUNDONGOS E  
CAPRINOS**

UFMG

2013

**DAYANA RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA INFECÇÃO POR UMA LINHAGEM ATENUADA DE  
*Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAMUNDONGOS E CAPRINOS**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.*

**Orientador: Prof. Dr. Vasco Azevedo**

Belo Horizonte

2013

## EPÍGRAFE

*“Sabemos que precisamos mudar, fazer diferente, tomar novas atitudes, mas não sabemos como e nem por onde começar! Faz sentido! Não são poucas as pessoas que vêm nos alertando sempre o quanto uma mudança interior requer um conjunto de pré-requisitos e que de fato, não é fácil. Mas também é certo que esta é a única forma de fazer a vida valer a pena: tornar-se você, dia após dia, aprendendo a retirar as carapuças, remover crenças que não são suas e que feito ostra, encontrar enfim, a pérola dentro de si mesmo! Pra começar, é preciso querer, querer mesmo, de verdade. Mas querer apenas não basta! Mudar é um processo, um caminho e não o apertar de um botão qualquer, que feito um interruptor de lâmpada, faz tudo clarear com apenas um clique. Portanto, se você deseja mudar da noite para o dia, esqueça! Só se muda vivendo, tentando, errando, exercitando um “eu” mais autêntico todos os dias. É preciso ter as ferramentas certas e principalmente saber usá-las. Cada um tem de encontrar a sua, ou seja, DECISÃO, AÇÃO E MOVIMENTO. Mudar é agir e agir de um jeito diferente! Então acorda! Pare de reclamar, choramingar, dar desculpas, adiar ou ficar assistindo a vida passar. A grande maioria das pessoas que realmente são felizes teve que fazer por onde, trilhar seu próprio caminho, descobrir quem elas eram e como poderiam se posicionar no mundo. Para isso, se você que realmente quer ser feliz, terá de fazer alguma coisa por si mesmo. Terá que criar sua história, fazer suas próprias regras e abrir o seu caminho, o que te conduzirá exatamente aonde você quer chegar! Mas lembre-se: um passo de cada vez, um dia de cada vez e buscando ajuda, porque ela é sempre essencial”.*

(Andréa Faffine)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à você mãezinha. “Para meu anjo se lembrar que quando queremos:

**podemos!!”**

Com toda gratidão, honra e amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pai todo poderoso que nos concede a graça de aprendermos com nossos desafios.

Ao Prof. Vasco Azevedo, meu orientador, que me deu a honra de participar do seu laboratório, me acolhendo e estimulando sempre ao processo de crescimento profissional e pessoal. Obrigada Prof. Vasco por tudo. Serei eternamente grata.

A Fernanda Dorella, quem considero minha co-orientadora, por tudo que fez por mim. Obrigada pela confiança, carinho, pelos excelentes momentos que compartilhamos e pela sua grande amizade.

Ao Luis Pacheco, meu Chefinho, por ter sido meu pai científico, amigo e que me ensinou que com humildade, trabalho e perseverança, chegamos onde queremos.

Ao Prof. Raphael Hirata Junior, que nos momentos dos “desesperos experimentais” sempre tinha conselhos para me acalmar. Obrigada pelo seu conhecimento, pela sua eterna ajuda e amizade.

Ao Prof. Ricardo Portela nosso ilustre colaborador que sempre nos ajuda a desvendar os mistérios da imunologia. Obrigada pela dedicação, atenção e orientação.

A Miriam Costa Franco que me ajudou desde a construção dos gráficos, das ideias e da escrita. Obrigada querida pelo apoio e carinho. Sua ajuda foi fundamental.

Aos amigos do LGCM, sempre presentes, solidários e unidos. Desde 2007 vocês me consideraram como um membro da família LGCM. Meu muito obrigada a todos vocês: aos eternos, antigos e novatos, por terem feito toda a diferença na minha vida.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Microbiologia por terem me dado suporte necessário para a realização deste projeto.

Aos professores, pós-doutorandos, doutorandos, mestrando e alunos colaboradores que não mediram esforços para nos apoiar, ajudar e realizar diversos experimentos.

A minha família que sempre me apoiou, torceu pelo meu crescimento e entendeu a minha ausência ao longo desses anos. É por vocês que estou aqui.

A Renata Furlan, minha irmãzinha científica, que participou de várias etapas deste projeto, colaborou com sua persistência, ajuda e muito companheirismo. Você é um exemplo pra mim!

Minha eterna gratidão aos meus amigos que tornaram essa caminhada mais leve: VP (*“as pessoas dizem que a motivação não dura. Nem o banho. E é por isso que ele é recomendado*

*diariamente*”), obrigada a minha orientadora Andréa pelas motivações semanais; PD (“*eu não preciso de asas para voar... eu danço!*”), Fisiopraxis, CE Albino Teixeira, Nha Damo, AMEJ, Renato e a todos que me deram o conforto de um sorriso.

As palavras não conseguem expressar a gratidão que sinto pela ajuda de todos.

## RESUMO

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva, patógeno intracelular facultativo, causador da Linfadenite Caseosa (LC) em caprinos e ovinos. Essa doença consiste em desenvolvimento de abscessos em linfonodos superficiais e internos. A infecção por *C. pseudotuberculosis* representa um grande impacto na produção de subprodutos da ovinocaprinocultura em diversos países, e até o presente momento não existem informações suficientes a respeito da profilaxia imunológica contra a doença. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas alternativas vacinais contra a LC. Através da mutagênese aleatória utilizando-se o sistema TnFuZ, foi obtida uma linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis*, chamada de CP13, a qual demonstrou resultados promissores em ensaios de imunização em camundongos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade protetora da CP13 em modelo murino e caprino. Na primeira parte do estudo foram avaliadas as respostas imunes humoral e celular produzidas após uma inoculação intraperitoneal com a linhagem mutante CP13 em camundongos BALB/c. As respostas induzidas foram avaliadas durante 28 dias, com posterior desafio utilizando linhagem virulenta. Títulos de IgG1 e IgG2a no soro foram determinados e as respostas imunes celulares foram medidas por mensuração de TNF-alfa, IL-10, IL-4 e IFN-gama em células esplênicas. O ensaio piloto de imunização em caprinos avaliou o potencial desta linhagem na redução das lesões causadas pela LC. Vinte e três cabritos jovens receberam uma ou duas doses da CP13, por via subcutânea, e uma infecção experimental com linhagem virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis* foi feita 30 dias após a imunização. O perfil de resposta imune do tipo Th1 induzido por esta linhagem recombinante em modelo murino provavelmente é responsável pela proteção observada. Em caprinos, as avaliações realizadas revelaram que o tratamento com duas doses apresenta potencial na redução das lesões em linfonodos após desafio com linhagem virulenta.

**Palavras-chaves:** Linfadenite caseosa, caprinos, vacina recombinante, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

## **ABSTRACT**

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a Gram-positive, facultative intracellular pathogen that causes Caseous Lymphadenitis (CLA) in goats and sheep. CLA consists of abscesses development in superficial and internal lymph nodes. Infection with *C. pseudotuberculosis* represents a significant economic impact in sheep and goat herd worldwide. Until now, there is no efficient tool for the immune prophylaxis of the disease. Thus, it is need the development of new alternatives against CLA. Through random mutagenesis using TnFuZ, it was obtained an attenuated strain of *C. pseudotuberculosis*, CP13, which presented promising results in mice vaccination trials. Firstly, the aim of this study was to evaluate the humoral and cellular immune responses in BALB/c mice following one intraperitoneal inoculation with the live mutant strain of *C. pseudotuberculosis*. The induced responses were assessed over a twenty-eight days period and mice were challenged with a virulent strain. Titers of IgG1 and IgG2a in serum were determined and cellular immune response were evaluated by quantification of TNF-alfa, IL-10, IL-4, IFN-gamma by enzyme linked immunosorbent assay in splenocytes. Secondly, a pilot test assessed the potential of this vaccine strain in reducing injuries caused by LC in goats. Twenty-three young goats received one or two doses of the recombinant strain, and an experimental infection with virulent strain MIC-6 of *C. pseudotuberculosis* were done 30 days post-immunization. The Th1 immune response profile characteristic induced by this recombinant strain in mice is probably responsible for the protection observed. Also the observations in goats revealed that treatment with two doses can be more effective in reducing injuries in lymph nodes.

**KEYWORDS:** Caseous Lymphadenitis, goats, recombinant vaccine, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.