UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAMUNDONGOS

LAIS CRISTINA OLIVEIRA ALVARENGA

Campo Grande-MS
2017

LAIS CRISTINA OLIVEIRA ALVARENGA

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares

Campo Grande-MS
2017

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)

UFMS

Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Mestrado

Aos catorze dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezessete, às treze horas e trinta minutos, na sala F da pós-graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Flábio Ribeiro de Araújo (Embrapa/CNPGC), Grácia Maria Soares Rosinha (Embrapa/CNPGC) e Lenita Ramires dos Santos (EMBRAPA CNPGC), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **LAÍS CRISTINA OLIVEIRA ALVARENGA**, CPF 01325775266, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título **"AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA Corynebacterium pseudotuberculosis EM CAMUNDONGOS"** e orientação de Cleber Oliveira Soares. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dr. Flábio Ribeiro de Araújo	Flabio Araújo	APROVADA
Dra. Grácia Maria Soares Rosinha	GMSRosinha	Aprovada
Dra. Lenita Ramires dos Santos	L. R. Santos	APROVADA
Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos (Suplente)		

RESULTADO FINAL:

[X] Aprovação [ ] Aprovação com revisão [ ] Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Flabio Araújo
Presidente da Banca Examinadora

Aluna

Embrapa

Gado de Corte

Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Corte

CERTIFICADO

Protocolo Nº: 017/2014
Pesquisador / Orientador: Grácia Maria Soares Rosinha
Responsável pelo Projeto: Grácia Maria Soares Rosinha
Título do Projeto: Avaliação de vacinas de DNA contra Corynebacterium pseudotuberculosis utilizando quitosana como carreador.

A CEUA da Embrapa Gado de Corte, após análise das adequações solicitadas, emitiu o parecer **APROVADO** referente a este Protocolo, conforme exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Vanessa Felipe de Souza
Coordenadora da CEUA

Campo Grande, 20 de março de 2015.

Vanessa Felipe de Souza
Médica Veterinária - Virologista
CRMV - MS 03348-VP

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Avenida Rádio Maia, 830, Zona Rural – 79106 550 Campo Grande MS
Telefone (67) 3368 2000 Fax (67) 3368 2150
www.cnpgc.embrapa.br

A Deus, por ter iluminado meu caminho e guiado meus passos. Aos meus amados pais, Silvia e Zuilo, pelo amor, carinho e confiança e ao meu esposo Paulo, companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pai misericordioso, por estar sempre presente em minha vida, me protegendo de todo mal e me dando saúde e sabedoria para seguir em frente, em busca de meus sonhos.

Aos meus pais, Silvia e Zuilo, por todo amor que me deram, pelos valores que me ensinaram e por me criarem em uma base familiar extremamente consolidada, além de ser fonte de inspiração para mim, sem eles minha vida não teria sentido.

Ao meu esposo Paulo Alvarenga, pelas palavras e atitudes carinhosas, por todo apoio e incentivo aos meus estudos e por ser mais que um esposo, ser um verdadeiro amigo, companheiro leal, e também, minha fonte inspiradora, tanto profissional quanto pessoal.

Ao meu orientador, Dr. Cleber Oliveira Soares, por me conceder a oportunidade de estar concluindo mais esta etapa profissionalizante e por ser uma pessoa que admiro muito, por sua inteligência e caráter.

À Dra. Grácia Maria Soares Rosinha, por todos os ensinamentos, paciência e gentileza. Por ser uma pessoa incrível, que me espelho profissionalmente e pessoalmente.

À Dra. Lenita Ramires dos Santos, por todos os ensinamentos durante o mestrado e por sempre estar disposta a esclarecer quaisquer dúvidas, com paciência e muita delicadeza.

À Dra. Renata Bastos, Dr. Cleber Galvão e Dra. Aline Gonçalves, por todos os ensinamentos e ajudas no desenvolvimento deste projeto, além da grande amizade que construímos nesse período.

A todos os alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorandos do Laboratório de Engenharia Genética Animal (EMBRAPA), Cynthia Mantovani, Steffany Morceli, Juliana Gomes, Marrielen Caitano, Anna Letícia Louzan, Matheus Santana, Letícia Lopes e Thiago Dutra. Muito obrigada pela companhia diária e pelos momentos divertidos que compartilhamos.

À técnica do Laboratório, Maria Goretti dos Santos, pela ajuda oferecida no desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão das bolsas de estudo.

A todos vocês, muito obrigada.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. OBJETIVOS 17
3. REVISÃO DE LITERATURA 18
3.1. Linfadenite caseosa 18
3.2. Microrganismo 18
3.3. Propriedades bioquímicas 19
3.4. Epidemiologia 20
3.5. Transmissão 23
3.6. Patogenia 24
3.7. Determinantes moleculares de virulência 25
3.8. Potencial zoonótico 28
3.9. Resposta imune contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* 30
3.9.1. Resposta imune inata 30
3.9.2. Resposta imune adaptativa 32
3.10. Sinais clínicos 34
3.11. Diagnóstico 35
3.12. Tratamento 39
3.13. Controle e profilaxia 40
3.14. Vacina de proteína recombinante e vacina de dna 42
3.15. Nanopartículas de quitosana 45
3.16. Vacinas comerciais contra linfadenite caseosa 46
3.17. Vacinas experimentais contra linfadenite caseosa 46
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48
MANUSCRITO 64
AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAMUNDONGOS 64
RESUMO 64
1. Introdução 65
2. Materiais e métodos 67
2.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento 67
2.2. Camundongos e ética na experimentação animal 68

2.3. Construção plasmidial 68
2.4. Preparação de DNA/nanopartículas 70
2.5. Ensaio de proteção do DNA encapsulado por quitosana 70
2.6. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE) 71
2.7. Detecção da expressão do gene psec, *in vivo*, por RT-PCR 72
2.8. Expressão gênica e purificação da proteína recombinante 72
2.9. SDS-PAGE e *Western blotting* 73
2.10. Imunização, desafio e análise de proteção vacinal 74
2.11. Determinação da resposta imune humoral 76
2.12. Avaliação da resposta imune celular 78
2.13. Análise estatística 79
3. Resultados 79
3.1. Produção do plasmídeo vacinal pcDNA*psec* 79
3.2. Eficiência e proteção do pcDNA*psec* encapsulado 79
3.3. Avaliação da mensagem do gene *psec in vivo* 80
3.4. Expresão gênica de *psec*, purificação de PSECr e *Western blotting* 80
3.5. Avaliação da resposta imune humoral 81
3.6. Resposta imune mediada por células nos camundongos imunizados. 83
3.7. Avaliação da eficiência da proteção vacinal após desafio 83
4. Discussão 84
5. Agradecimentos 89
6. Referências 90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise de reação de clivagem do plasmídeo vacinal pcDNA*psec.*.....94

Figura 2: Eficiência de proteção contra DNAse I.....95

Figura 3: RT-PCR com cDNA obtido a partir do RNA total extraído de músculos de animais injetados com 100 µg de pcDNA*psec*+Quitosana.....96

Figura 4: Produção, purificação e avaliação da antigenicidade da PSECr.....97

Figura 5: Detecção de IgG específico para o antígeno PSECr.....98

Figura 6: Título final dos isotipos IgG1 e IgG2a nos soros dos camundongos, 47 dias após a primeira imunização.....99

Figura 7: Determinação da concentração das citocinas IFN-γ e IL-10 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos, obtidos de camundongos imunizados com as formulações vacinais e controles, por meio de ELISA de captura.....100

Figura 8: Curva de sobrevivência dos animais dos grupos testes e grupos controles, desafiados com $1x10^6$ da cepa virulenta CP 28033 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.....101

Figura 9: Orgãos de camundongos com alterações anatomopatológicas causadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, após desafio.....102

RESUMO

ALVARENGA, L.C.O. AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAMUNDONGOS. 2017. 102p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Linfadenite caseosa é uma doença infectocontagiosa, causada pela bactéria Gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis,* que acomete principalmente ovinos e caprinos. Há necessidade do desenvolvimento de novas vacinas mais eficientes contra *C. pseudotuberculosis,* entre estas, as vacinas de DNA e de proteínas recombinantes. Isto tem sido favorecido pelos estudos sobre o genoma desta bactéria e seus determinantes moleculares. Devido à magnitude da resposta imune das vacinas de DNA ser relativamente fraca, nanopartículas preparadas por biomateriais têm sido utilizadas com o intuito de aumentar a resposta imune induzidas por estas vacinas. Sendo assim, testamos a eficácia de uma vacina de proteína recombinante e de formulações de vacinas de DNA, baseadas no gene *psec*, contra *C. pseudotuberculosis.* Este gene codifica uma proteína de membrana que está envolvida na fisiologia da bactéria e invasão de células hospedeiras. Para isto, seis grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com pcDNA*psec*; pcDNA*psec*+Quitosana; pcDNA*psec*+PSECr; PSECr-Montanide e, PBS e quitosana como controles. Após a última imunização, os animais foram desafiados com cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. As vacinas pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide induziram, nos camundongos, uma forte resposta imune humoral, indicado pelos altos níveis de IgG no soro, com predominância de IgG1 no *prime-boost* e pela produção mista de IgG1/IgG2a na vacina de proteína recombinante. Estas duas vacinas também induziram uma forte resposta imune celular, evidenciada pelos níveis elevados de INF-γ produzidos por células T. Houve a produção de IL-10 estimulada por pcDNA*psec*+PSECr. Os níveis de proteção obtidos foram de 33,3% e 50% para as vacinas pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide, respectivamente. Portanto, as vacinas pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide induziram resposta imune mediada por anticorpos e células em camundondos e conferiram proteção contra infecção por *C. pseudotuberculosis*, sendo assim, consideramos estas vacinas como candidatas promissoras para o uso contra *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-Chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, vacina de proteína recombinante, vacina de DNA, quitosana.

ABSTRACT

ALVARENGA, L.C.O. Evaluation of immunogenicity and protection of recombinant vaccines against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. 2017. 102p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Caseous lymphadenitis (LC) is an infectious disease caused by the Gram-positive bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* and affects mainly sheep and goats. This disease causes significant economic losses in the sector of goat and sheep production. There is a need for the development of new, more efficient vaccines against *C. pseudotuberculosis*, including DNA and recombinant protein vaccines. This has been favored by studies on the genome of this bacterium and its molecular determinants. Due to the magnitude of the immune response of the DNA vaccines is relatively weak, nanoparticles prepared by biomaterials have been used to increase the immune response induced by these vaccines. Thus, we tested the efficacy of a recombinant protein vaccine and DNA vaccine formulations, based on the *psec* gene, against *C. pseudotuberculosis*. This gene encodes a membrane protein that is involved in bacterial physiology and invasion of host cells. For this, six groups of BALB / c mice were immunized with pcDNA*psec*; pcDNA*psec*+Chitosan; pcDNA*psec*+PSECr; PSECr-Montanide, and PBS and chitosan as controls. After the last immunization, the animals were challenged with virulent strain of *C. pseudotuberculosis.* In the mice, the pcDNA*psec*+PSECr and PSECr-Montanide vaccines induced a strong humoral immune response, indicated by the high levels of IgG in the serum, with predominance of IgG1 in the prime boost and by the mixed production of IgG1/IgG2a in the recombinant protein vaccine. These two vaccines also induced a strong cellular immune response evidenced by elevated levels of INF-γ produced by T cells. There was production of IL-10 stimulated by pcDNA*psec*+PSECr. The protection levels obtained were 33.3% and 50% for the pcDNA*psec*+PSECr and PSECr-Montanide vaccines, respectively. Thus, the pcDNA*psec*+PSECr and PSECr-Montanide vaccines induced antibody and cell mediated immune responses in mice, and provided protection against infection by *C. pseudotuberculosis*, therefore, we considered these vaccines as promising candidates for use against *C. pseudotuberculosis*.

Keywords: Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, recombinant protein vaccine, DNA vaccine, chitosan.

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, parasito intracelular facultativo, pleomórfico, não esporulado, não encapsulado e imóvel, sendo o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) em pequenos ruminantes e reações piogranulomatosas, linfangite ulcerativa, mastite e dermatite ulcerativa em bovinos, as quais são doenças de grande relevância médica e veterinária. Esta bactéria é patogênica para uma grande variedade de mamíferos incluindo ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos, suínos, equinos e seres humanos (BRITZ et al., 2014; ARAÚJO et al., 2016, SILVA et al., 2017).

Corynebacterium pseudotuberculosis tem mecanismos de sobrevivência interessantes e é capaz de utilizar estratégias diferentes para se adaptar ao seu ambiente (ARAÚJO et al., 2016). Uma vez que se estabelece com sucesso dentro de um hospedeiro, é capaz de replicar dentro de células fagocíticas, conseguindo evadir do sistema imunológico com aparente facilidade (DORELLA et al., 2013).

A prevalência da LC é elevada em muitas regiões do mundo, incluindo a América do Sul, com 78,9% de prevalência em caprinos (SEYFFERT et al., 2010) e 75,8% em ovinos (GUIMARÃES et al., 2011), no sudeste do Brasil. Há explicações para esta alta prevalência de LC, incluindo uma resistência elevada de diversas bactérias a baixas temperaturas e superfícies úmidas e a habilidade da bactéria em invadir o corpo do hospedeiro rapidamente por meio de lesões na pele (YERUHAM et al., 2004). A ampla disseminação do patógeno é também uma consequência da baixa eficácia dos antibióticos que não conseguem atuar nas bactérias devido à presença do abscesso formado em torno do patógeno (MOURA-COSTA et al., 2008).

A LC tem causado grande impacto nos criatórios, além de provocar significativas perdas aos produtores de ovinos e caprinos em todos os países, devido a fatores como a capacidade reprodutiva diminuída, redução do rendimento da carne, lã, leite, pele, atraso no crescimento, menor ganho de

peso, descarte precoce de animais, além da comercialização dos animais por valor inferior ao praticado no mercado (MEYER et al, 2002; SOUZA et al., 2011).

O controle da LC deve estar baseado em medidas que possam inibir a entrada e disseminação de *C. pseudotuberculosis* no rebanho. Entre as possibilidades tem-se a identificação e eliminação de animais acometidos, drenagem dos abscessos e o desenvolvimento de vacinas que sejam eficazes (RIBEIRO et al., 1991; ALVES et al., 2007; ANDRADE et al., 2012).

Com a finalidade de obter uma vacina protetora e mais segura contra diversos patógenos, inclusive *C. pseudotuberculosis*, diferentes estratégias vêm sendo testadas, como vacinas de proteínas recombinantes e de DNA. Ambas apresentam potencial protetor, sem riscos de causar a doença e, induzem resposta imune humoral e celular (JAIN et al., 2014; DROPPA-ALMEIDA et al., 2016).

Entre os sistemas de administração de antígenos, as nanopartículas preparadas por biomateriais, como a quitosana, podem oferecer várias vantagens em relação a outros sistemas de entrega (ZHAO et al., 2014). Por exemplo, elas podem proteger o antígeno contra a degradação *in vitro* e *in vivo*; limitar a distribuição sistêmica, reduzindo a dose e os prováveis efeitos colaterais; além de melhorar a captação e apresentação do antígeno, resultando em aprimoramento de respostas imunes adaptativas (GERDTS et al., 2013).

A quitosana por ser um polímero biodegradável possui a vantagem de prevenir o seu acúmulo nas células, se sucessivas administrações forem necessárias, além de apresentar reduzida toxicidade. A degradação do polímero é essencial para a liberação do DNA dentro do citosol. Entretanto, outra característica que torna a quitosana um material promissor para a liberação de DNA é que essa entrega é lenta, de longo prazo (JAYAKUMAR et al., 2010).

Em um projeto desenvolvido por este grupo de pesquisa, foram identificados alguns genes com potencial antigênico a partir da imunovarredura de uma biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis*, para a produção de vacinas recombinantes, com o objetivo de analisar o papel de proteínas

possivelmente antigênicas produzidas dentro das células do hospedeiro. O gene *psec* codifica uma proteína de membrana, que ainda não apresenta função bem definida em *C. pseudotuberculosis*, porém em estudos realizados com outras bactérias indicam que as proteínas da superfamília PSEC são importantes na fisiologia bacteriana. O domínio desta proteína proporciona uma atividade de hidrolase, e as proteínas com este domínio incluem endopeptidases, amidases e aciltransferases que estão envolvidas no crescimento, desenvolvimento, divisão celular, maturação da parede celular, e também virulência (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003, XU et al., 2011).

Assim, objetivou-se com este estudo avaliar o potencial imunoprotetor em camundongos BALB/c da vacina de proteína recombinante PSEC associada ao adjuvante Montanide™ ISA 61 VG e das formulações de vacinas de DNA.

2. OBJETIVOS

- Confeccionar o gene sintético *psec* de *C. pseudotuberculosis* em vetor para expressão em organismo procarioto;

- Produzir e purificar o produto proteico recombinante PSEC a partir de sistema heterólogo (*Escherichia coli*);

- Determinar a presença de RNA mensageiro para o gene *psec in viv*o;

- Associar e analisar o plasmídeo vacinal à nanopartículas de quitosana;

- Imunizar camundongos BALB/c com as formulações vacinais propostas e, avaliar a imunogenicidade destas por meio da análise das respostas imunes humoral e celular;

- Avaliar a proteção conferida pelas formulações vacinais propostas em camundongos BALB/c, após desafio com cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. LINFADENITE CASEOSA

Linfadenite caseosa (LC) é uma doença infectocontagiosa crônica causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*; esta bactéria é patogênica para uma grande variedade de mamíferos e foi isolada em várias espécies, incluindo cavalos, gado, camelos, suínos, búfalos e, em seres humanos (ARAÚJO et al., 2016), mas é em ovinos e caprinos que assume importante papel sanitário e econômico. Nestes animais, a LC não produz alta mortalidade, mas causa importantes perdas econômicas por comprometer a pele, peso, leite, carne e carcaça (DORELLA et al., 2013).

Quando a doença é caracterizada por abscessos em nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos, é denominada linfadenite caseosa superficial ou externa, quando os órgãos internos, tais como pulmões, rins, fígado e baço são acometidos, ela é denominada como linfadenite caseosa visceral (DORELLA et al., 2009; JESSE et al., 2011; HOELZLE et al., 2013).

As formas superficial e visceral da LC podem coexistir em infecções assintomáticas, sem sinais clínicos aparentes, dificultando o seu diagnóstico (JESSE et al., 2011).

3.2. MICRORGANISMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é um patógeno intracelular facultativo, bactéria Gram-positiva, pertencente ao grupo de actinobactérias conhecido como CMNR (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*) (BASTOS et al., 2012; SILVA et al., 2017). Esse grupo possui características em comum, como parede celular composta principalmente de peptideoglicanos, arabinogalactano e ácidos micólicos, e o alto conteúdo G+C

do genoma (47-74%) (GUIMARÃES et al., 2011). Vários genomas do grupo CMNR têm sido depositados no NCBI, indicando a crescente importância médica, veterinária e biotecnológica desses organismos (BASTOS et al., 2012). Dentro do gênero *Corynebacterium*, a espécie *Corynebacterium pseudotuberculosis* é relatada como uma bactéria intracelular facultativa de importância veterinária, sendo o agente etiológico da linfadenite caseosa, que acomete principalmente ovinos e caprinos (ARAÚJO et al., 2016).

Morfologicamente, *C. pseudotuberculosis* são bactérias com dimensões que variam entre 1,0-3,0 µm de comprimento por 0,5-0,6 µm de diâmetro, sendo coradas positivamente pelo método de Gram, são desprovidas de motilidade, cápsulas e esporos e exibem variação em suas formas, podendo apresentar aspecto cocóide ou bacilar filamentoso (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria anaeróbia facultativa e sua condição ótima de crescimento é a 37ºC, em um pH que varia de 7,0 a 7,2. Este patógeno cresce bem em ambiente com 5% de CO_2, além de ser exigente do ponto de vista nutricional, crescendo bem em meios enriquecidos como ágar sangue, ágar BHI, caldo BHI ou enriquecidos com soro animal. Na superfície do ágar sangue, são formadas colônias pequenas, com aparência seca, friável e de coloração branco-acinzentada. Após vários dias de incubação, as colônias podem chegar a 3 mm de diâmetro e exibirem uma coloração creme (QUINN et al., 1994; COSTA, 2002; GUEDES et al., 2015).

3.3. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS

Quanto às reações bioquímicas, cepas de *C. pseudotuberculosis* se caracterizam por apresentar elevada capacidade fermentativa, fazendo uso de uma variada fonte de carboidratos, tais como a glicose, ribose e frutose, maltose, com produção de ácido, entretanto, sem produzir gás. Apresentam reatividade positiva para os testes de catalase e urease, porém a habilidade na redução do

nitrato é variável (PÉPIN; BOISRAM; MARLY, 1989; SELIM, 2001; GUIMARÃES et al., 2011).

O peptidoglicano da parede celular é baseado no ácido meso-diaminopimelico, relacionado à resistência da parede celular contra a maioria das peptidases, mas a arabinose e galactose são os principais açúcares da parede. Cadeias curtas de ácido micólico, uma molécula que apresenta efeitos citotóxicos sobre os fagócitos, também são encontradas (PUECH et al., 2001; SELIM, 2001).

A bactéria *C. pseudotuberculosis* foi classificada em dois biovares, ovis e equi. As cepas isoladas de ovinos e caprinos classificadas como biovar ovis, por serem geralmente negativas na atividade da redutase do nitrato, e as estirpes isoladas de cavalo e gado, que são geralmente positivas no teste de redução de nitrato, foram classificadas como biovar equi (OLIVEIRA et al., 2016).

Um teste bioquímico bem estabelecido para identificação de bactérias do gênero *Corynebacterium* é o sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France), este é composto por 21 testes bioquímicos, que podem ser realizados no período de 24 a 48 horas. O *kit* apresenta 20 tubos contendo os substratos para 11 testes enzimáticos (pirazinamidase, redução de nitrato, fosfatase alcalina, β-galactosidase, pirrolidonil arilamidase, α-glucosidase, *N*-acetyl-β-glucosaminidase, hidrolise de gelatina, esculina, urease e glucuronidase) e oito testes para fermentação de carboidratos composto (manitol, maltose, sacarose, glucose, D-Xylose, glicogênio, lactose e ribose) (DORELLA et al., 2006).

3.4. EPIDEMIOLOGIA

A linfadenite caseosa é uma doença de ampla distribuição mundial, sendo diagnosticada na Europa, Oceania, Américas do Sul e do Norte, Ásia, África e o Meio Leste. A infecção por *C. pseudotuberculosis* tem se estabelecido em vários

países como Brasil, Austrália, Nova Zelândia, Reino Unido, Canadá e EUA, causando forte impacto econômico na caprinocultura, e principalmente na ovinocultura, devido a redução na produção de lã, carne e leite, além da condenação, no frigorífico, de carcaças e couro afetados pela doença (BAIRD e FONTAINE, 2007; DORELLA et al., 2009).

Apesar de vários países apresentarem problemas relacionados com a linfadenite caseosa, um grande número provavelmente é subnotificado, uma vez que a declaração a OIE é feita somente pelas autoridades sanitárias oficiais de cada país. Há países que tiveram esta doença relatada em artigos científicos e ainda não fizeram uma declaração oficial, incluindo o Brasil (GUIMARÃES et al., 2011).

A prevalência e a incidência desta enfermidade em rebanhos caprinos e ovinos estão relacionadas às condições inadequadas do ambiente, por diminuição das defesas orgânicas dos animais e pela falta de um adequado programa sanitário de prevenção e controle da linfadenite caseosa (BLOOD e HENDERSON, 1999). Esta doença ocorre em todas as raças, sexos e estações do ano, sendo os animais adultos, os mais comumente acometidos (KIMBERLING, 1988; MEYER et al., 2002). Nos rebanhos infectados com *C. pseudotuberculosis*, a morbidade pode estar acima de 15%, sendo que a maioria dos animais afetados, geralmente, são aqueles entre quatro e cinco anos de idade, podendo ocorrer também em animais com seis meses de vida (KIMBERLING, 1988).

A linfadenite caseosa geralmente está associada a uma debilidade geral no animal, com diminuição do ganho de peso, queda na eficiência reprodutiva, desvalorização da pele devido às cicatrizes resultantes dos abscessos, elevação dos custos com medicamentos para o tratamento das lesões externas, redução da produção de leite e carnes, condenação de carcaças e vísceras e, nos casos mais graves, resultar na morte dos animais (MEYER et al., 2002; SOUZA et al., 2011).

Nos últimos anos, a produção de caprinos e ovinos tem representado uma parte importante no contexto do agronegócio brasileiro, sendo caracterizada como uma atividade cultural, social e econômica muito importante, principalmente, para o Nordeste do Brasil, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento desta região (SANTIAGO et al., 2013). A ocorrência da linfadenite caseosa já foi identificada em diversos estados, com destaque para a região nordeste, causando grandes prejuízos, principalmente para pequenos criadores (COSTA, 2002; SOUZA et al., 2011).

No estado do Ceará, Pinheiro et al. (2000) relataram 66,9% de rebanhos caprinos com presença de sinais clínicos sugestivos de linfadenite caseosa. Na Paraíba, 15,9% dos ovinos avaliados apresentavam lesões similares a linfadenite caseosa, sendo que em 74,5% dos abscessos, foi isolado *C. pseudotuberculosis* (SOUZA et al., 2011). Em um estudo sobre a linfadenite caseosa em ovinos e caprinos no sertão Paraibano, Sóstenes e colaboradores (2012) identificaram que 7,7% (49/640) dos animais apresentavam evidências clínicas de linfadenite caseosa, sendo que sete ovinos apresentavam abscessos íntegros, e em oito abscessos foram isolados e identificados *C. pseudotuberculosis*. Em outro estudo, também realizado na Paraíba, foi observado que 15,9% (236/1466) dos ovinos abatidos em frigorífico apresentaram lesões macroscópicas semelhantes à LC (SOUZA et al., 2011).

A LC também está se tornando um grande problema para as regiões norte, centro-oeste e sudeste, onde esta atividade está crescendo rapidamente, afetando de maneira negativa a indústria de processamento da carne ovina (GUIMARÃES et al., 2009). A prevalência desta doença entre ovelhas no estado de São Paulo chega a 71%, e a prevalência em Minas Gerais, estado onde a ovinocultura tem apresentado grande crescimento, é de aproximadamente 75,8% entre ovinos (GUIMARÃES et al., 2011) e 78,9% entre caprinos (SEYFFERT et al., 2010).

3.5. TRANSMISSÃO

A transmissão de *C. pseudotuberculosis* pode ocorrer por ingestão de água e alimentos contaminados, por contato direto com as secreções dos abscessos, bem como através da pele, normalmente como resultado de ferimentos superficiais ou pequenas abrasões geradas tanto por procedimentos de manejo como tosquia, castração, tratamento do cordão umbilical e agulhas contaminadas, quanto por fatores naturais como arbustos pontiagudos (SOBRINHO, 2001; ALVES et al., 2007; RIET-CORREA, 2007).

As portas de entrada para o agente infeccioso da linfadenite caseosa variam entre ovinos e caprinos, podendo refletir na diferença anatômica na localização dos abscessos (COSTA, 2002; CETINKAYA et al., 2002). Nos ovinos, a disseminação de *C. pseudotuberculosis* através da pele, após as tosquias e banhos de imersão parecem representar os principais fatores de risco na transmissão do patógeno, resultando em abscessos de pele em várias regiões do corpo, além de infartamento de linfonodos regionais (COSTA, 2002). Já nos caprinos, a alimentação com forragens grosseiras e as abrasões em animais alimentados em canzis, determinariam o predomínio da linfadenomegalia por *C. pseudotuberculosis* em região de cabeça e pescoço (CETINKAYA et al., 2002).

A inalação de material purulento, oriundo dos abscessos, pode causar o desenvolvimento de abscessos pulmonares, ou ainda, pneumonia nos ovinos. Lesões nas tonsilas e nos linfonodos retrofaríngeos de um animal podem ser responsáveis pela infecção aerógena de outros animais que estiverem em contato (COLLETT et al., 1994; WILLIAMSON, 2001).

A contaminação ambiental é considerada um fator de grande relevância na disseminação da enfermidade, pois *C. pseudotuberculosis* é capaz de sobreviver no ambiente por longos períodos, principalmente se estiver sob baixas temperaturas e condições de umidade. O microrganismo pode sobreviver em frestas de piso em temperatura ambiente por até 10 dias, na madeira por

uma semana, feno por oito semanas, no solo durante oito meses ou mais de um ano em fômites (ALVES; PINHEIRO, 1997; COLLETT et al., 1994).

Em cavalos, foram identificadas três espécies de moscas como potenciais vetores, *Haematobia irritans, Stomoxys calcitrans* e *Musca domestica* (YERUHAM, 1996; BRAVERMAN et al, 1999; SPIER et al., 2002). Barba e colaboradores (2015) também demonstraram que *M. domestica* pode servir como vetor mecânico de *C. pseudotuberculosis* biovar equi em cavalos, em transmissão experimental.

A infecção crônica por *C. pseudotuberculosis* pode resultar em transmissão vertical e ocasionar desordens reprodutivas como aborto e mortalidade neonatal, além de redução nas taxas de crescimento de cordeiros infectados e persistência da infecção no rebanho (ALONSO et al.,1992).

3.6. PATOGENIA

O mecanismo de desenvolvimento das lesões de linfadenite caseosa se inicia logo após a penetração de *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro, que em geral ocorre através da mucosa oral, nasal e ocular, ou ainda por meio de lesões na pele. O microrganismo se propaga rapidamente pelo sistema linfático até o linfonodo, onde produz uma exotoxina, responsável pela formação do abscesso e infiltração contínua de células inflamatórias, aumentando a permeabilidade vascular. A exotoxina fosfolipase D (PLD) permite a instalação deste patógeno em órgãos viscerais e nódulos linfáticos, e consequentemente a formação de lesões em vários lugares, principalmente nos linfonodos mediastinais, mas também podendo ocorrer no fígado, rins, coração, medula espinhal, testículos, glândula mamária e via respiratória. Observa-se que lesões pulmonares são bastante comuns e podem se apresentar como a principal fonte de contaminação no rebanho através da produção de aerossóis infectados (MCKEAN et al., 2007; FONTAINE; BAIRD, 2008; AL-GAABARY et al., 2009).

Corynebacterium pseudotuberculosis é capaz de sobreviver à fagocitose pelos macrófagos e se multiplicar dentro dos fagolisossomos, evitando sua eliminação pelas células do sistema imune e induzindo a produção de resposta inflamatória com formação de tecido fibroso em torno à infecção (MOTTA, CREMASCO, RIBEIRO, 2010). Alguns macrófagos não produzem óxido nítrico em resposta a *C. pseudotuberculosis*, *in vivo*, resultando na compensação ineficaz do organismo (BOGDAN et al., 1997). Estes efeitos podem ser associados com a camada lipídica da parede celular de *C. pseudotuberculosis* e outros componentes antigênicos que atenuam a produção de óxido nítrico por macrófagos (BASTOS et al., 2012).

Na tentativa do hospedeiro em conter e eliminar *C. pseudotuberculosis,* ocorre formação de granulomas. Estes são formados pelo surgimento de necrose caseosa em células epitelióides que posteriormente são flanqueados por células epiteliais, linfócitos e tecido conjuntivo fibroso. Isto ocorre várias vezes sobre o tecido conjuntivo fibroso, resultando no nódulo final formado por uma massa esférica laminada com aspecto de cebola, característico da linfadenite caseosa (FONTAINE; BAIRD, 2008). Estes granulomas são formados em decorrência da resposta imune adaptativa, que pode ser tanto humoral como celular (PAULE, 2003).

3.7. DETERMINANTES MOLECULARES DE VIRULÊNCIA

Os determinantes moleculares de virulência de *C. pseudotuberculosis* são pouco conhecidos, assim como suas ações sobre o controle da expressão gênica (MCKEAN et al., 2007, RUIZ et al., 2011), mas é sabido que estão envolvidos nos processos de adesão, invasão, adaptação e dispersão do patógeno no hospedeiro. Os genes que exercem estas funções, são induzidos durante a infecção e o mecanismo que os ativam ou reprimem estão muitas

vezes relacionados ao ambiente exposto ao microrganismo (SCHUMANN, 2007).

Os genes de *C. pseudotuberculosis* mais estudados são aqueles relacionados à virulência, como é o caso do gene *pld*, que codifica a exotoxina PLD (SOARES et al., 2013). A PLD tem sido considerada como o determinante molecular de virulência mais importante contra *C. pseudotuberculosis,* sendo encontrada no citoplasma, e, em menor quantidade, na parede celular bacteriana. Sua massa molecular varia de 14.500 a 31.000 Daltons. Essa exotoxina funciona como um fator de permeabilidade que promove a disseminação da bactéria a partir do local inicial de infecção a todos os tecidos do corpo do hospedeiro, provocando sérios danos (BASTOS et al., 2012; SÁ et al., 2013), além disso, causa lesões dermonecróticas, e em doses mais elevadas, se mostra letal para diversas espécies de animais, tanto domésticos, quanto de laboratório (ALVES et al., 2007; FONTAINE; BAIRD, 2008; SOUZA et al., 2011).

Em estudos realizados por Brown e colaboradores (1986), utilizando anticorpos específicos anti-PLD, demonstrou-se que esta exotoxina é muito importante para a disseminação de *C. pseudotuberculosis*. Além disso, a vacinação de cabras com PLD inativada foi capaz de prevenir a propagação das bactérias após desafio experimental.

Os mecanismos pelos quais a expressão do promotor PLD é controlada continuam a ser elucidados. A observação de que o PLD é regulado diferencialmente por várias condições ambientais, propõe que os processos envolvidos sejam provavelmente multifatoriais, podendo envolver mecanismos como a ligação de repressores ou ativadores, ou mudanças na estrutura do DNA, provocadas por mudanças na temperatura (MCKEAN et al., 2007). Pacheco e colaboradores (2011) compararam os proteomas de duas cepas de *C. pseudotuberculosis* e demonstraram que a PLD foi codificada apenas no material isolado virulento.

Genes relacionados à captação de ferro também foram apontados como importantes determinantes moleculares de virulência de *C. pseudotuberculosis.* Foi identificado um *cluster* gênico constituído por quatro genes organizados em um operon (*fag*), *fagABCD* (SÁ et al., 2013). Estes genes são de grande relevância por possibilitarem a aquisição de ferro em ambientes hostis, como o ambiente intracelular, onde este nutriente é escasso (BILLINGTON et al., 2002). O ferro é um nutriente essencial para a vida bacteriana, assim diversos patógenos, necessitam da aquisição de ferro para favorecer seu crescimento e estabelecer o processo infeccioso (CASSAT; SKAAR, 2013).

Os genes *fagA* e *fagB* se assemelham com permeases da membrana citoplasmática, o gene *fagC* se assemelha a proteína citoplasmática ligante de ATP e o gene *fagD* se assemelha a uma proteina sideróforа ligante ao ferro (SÁ et al., 2013). Em um estudo realizado por Billington e seus colaboradores, em 2002, foram investigados os efeitos da disponibilidade de ferro na regulação desses genes, a partir de uma fusão com *lacZ* no início da primeira janela de leitura do operon. O operon *fagABC* apresentou baixa atividade em um meio rico em ferro e atividade três vezes maior quando em meio pobre em ferro, mostrando que esse operon é ativado em condições limitantes de ferro em um meio.

Os lipídeos da parede celular de *C. pseudotuberculosis* foram descritos há muito tempo como importantes fatores que contribuem para a patogênese da linfadenite caseosa (CARNE et al. 1956; HARD,1972; HARD,1975). Segundo Jolly (1966), linhagens mais virulentas possuem mais lipídeos que as linhagens atenuadas.

Esta bactéria tem uma quantidade significativa de lipídios na sua parede celular, denominados ácidos corinomicólicos, e que são semelhantes aos ácidos micólicos em paredes celulares de *Mycobacterium tuberculosis*, tendo como função proteger a bactéria contra a ação das enzimas proteolíticas presentes nos fagolisossomos do hospedeiro, promovendo assim a citotoxicidade local (BASTOS et al., 2012).

A introdução de tecnologias avançadas, como a espectrometria de massa (EM), gerou novas perspectivas para o estudo de proteínas bacterianas secretadas/excretadas. Uma análise comparativa do exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* foi realizada recentemente utilizando uma estratégia de proteômica de alto rendimento com base em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Este estudo investigou as proteínas que são exportadas a partir de bactérias, o que pode representar componentes chave da interação patógeno-hospedeiro e gerou um catálogo de exoproteínas, no qual podem ser identificados novos alvos para futuros trabalhos de determinantes moleculares de virulência de *C. pseudotuberculosis* (PACHECO et al., 2011).

3.8. POTENCIAL ZOONÓTICO

A linfadenite caseosa é considerada uma zoonose emergente, relacionada principalmente a pessoas que têm contato com animais infectados e a produtos lácteos contaminados. Além disso, *C. pseudotuberculosis* já foi relatado como o agente causador de mais de 33 casos de infecção em seres humanos (DORELLA et al., 2013).

O patógeno pode ser transmitido para o ser humano pelo contato com material purulento oriundo de lesões de pele, ou ainda abscessos de linfonodos (JOIN-LAMBERT et al., 2006). Peel e colaboradores relataram em 1997 um caso de linfadenite caseosa humana decorrente de ingestão de carne caprina crua e leite de vaca contaminados com a bactéria *C. pseudotuberculosis*.

A LC é considerada uma doença ocupacional, uma vez que acomete médicos veterinários, trabalhadores de frigoríficos e outros profissionais que mantém algum tipo de contato com os animais de produção, particularmente pequenos ruminantes e equinos (PEEL et al., 1997; ALVES et al., 2007). No entanto, entre 2005 e 2008, quatro casos de difteria por *C. pseudotuberculosis*

foram identificados na Europa e apenas um dos pacientes relatou apresentar contato com animais de fazenda (WAGNER et al, 2012).

As infecções humanas causadas por *C. pseudotuberculosis* são, na maioria das vezes, bem semelhantes às observadas em ovinos e caprinos. Estas infecções geralmente requerem a excisão dos linfonodos infectados, acompanhados por tratamento antimicrobiano suplementar, porém não envolvem manifestações toxemicas (TORRES et al., 2013).

Ovinos e caprinos são os animais mais comumente infectados dentro do amplo espectro de hospedeiros em que *C. pseudotuberculosis* causa a manifestação clínica. Entretanto, este microrganismo é considerado um problema de saúde pública emergente (BASTOS et al., 2012).

O primeiro relato de linfadenite caseosa em humanos foi feito por Lopez et al. (1966). O paciente apresentava quadro clínico caracterizado pela presença de fadiga, dor muscular, fígado aumentado e macio e linfadenopatia localizada. O diagnóstico foi confirmado por meio de isolamento e identificação microbiológica do material aspirado do linfonodo acometido e exame anátomopatológico. Liu e colaboradores (2005) reportaram uma infecção por este patógeno durante um implante ocular em um paciente. Na França, foi notificada uma outra jovem de 12 anos de idade com linfadenite necrosante por *C. pseudotuberculosis* (JOIN-LAMBERT et al., 2006). Um caso de endocardite por *C. pseudotuberculosis* produtor da toxina diftérica foi relatado em um usuário de drogas injetáveis ilícitas que não tinha história de contato animal, e nenhuma possível fonte de infecção foi identificada (WAGNER et al., 2010).

Além da produção de toxina diftérica por *C. pseudotuberculosis* lisogênica, estirpes comuns podem infectar os seres humanos e causar linfadenopatia supurativa. Patologicamente, ocorre substituição do tecido do linfonodo infectado por granulomas necrotizantes, enquanto a aparência histológica geral se assemelha a linfadenite tuberculosa, doença de Cat scratch e linfogranuloma, que devem ser considerados no diagnóstico diferencial (BASTOS et al., 2012).

3.9. RESPOSTA IMUNE CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis*

3.9.1. RESPOSTA IMUNE INATA

No processo inicial da infecção predominam células fagocitárias, como os neutrófilos, que são a primeira linha de combate e eliminam os organismos invasores, seguidos pelos macrófagos, que são recrutados na tentativa de controlar o foco infeccioso (PEPIN et al., 1994). A principal função das células fagocíticas é a eliminação dos microrganismos ingeridos, pelo mecanismo de fagocitose, liberando moléculas microbicidas nos fagolisossomos, como as enzimas proteolíticas e os intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

Os macrófagos atuam na eliminação dos microrganismos fagocitados, principalmente pela atuação do óxido nítrico (NO), que é um gás solúvel altamente lipofílico, produzido pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS). Esta produção pode ocorrer, prioritariamente, pela ação de citocinas denominadas de pró-inflamatórias, como INF-γ e TNF-α. O NO têm ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição dos patógenos através da sua ligação direta com metais, principalmente o ferro, presente nas enzimas do seu alvo. Entretanto, apesar desta poderosa ferramenta, a dificuldade que os macrófagos têm de eliminar *C. pseudotuberculosis*, aparentemente se deve a baixa produção de óxido nítrico, quando estimulados com as frações de antígenos deste microrganismo. A baixa produção de NO após estimulação com componentes desta bactéria, pode ser um fator determinante capaz de explicar o desenvolvimento de infecções crônicas em pequenos ruminantes. (JAMES, 1995; BOGDAN et al., 1997; NATHAN e SHILOH, 2000; DUSSE, VIEIRA, CARVALHO, 2003; MACHADO, 2004).

A atração de células fagocitárias para o sítio infeccioso, assim como a sua ativação podem ser influenciadas principalmente por um grupo de citocinas pró-inflamatórias (IL-1α, IL-6 e TNF-α). Dentre estas citocinas, tem destaque a

citocina IL-6, que atua na estimulação da produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e ainda a produção de neutrófilos (APPELBERG et al.,1994; LEAL et al.,1999; DIAS et al., 2011).

As citocinas IL-1α e TNF-α, atuam aumentando a permeabilidade vascular, e assim, permitindo a passagem de células recrutadas da resposta imune inata, além de promover a ativação destas células. O TNF-α também pode atuar como indutor de coagulação, sendo muito importante no processo de formação do granuloma. O excesso de TNF-α pode causar além de febre, algumas patologias, tais como hiperinflamação com necrose e caquexia e também choque séptico. Assim, esta citocina possui uma enorme importância na imunidade inicial contra *C. pseudotuberculosis*, sobretudo no foco inicial da infecção. Uma das funções da citocina INF-γ é a estimulação da expressão de moléculas do MHC de classe I e II, na superfície das células apresentadoras de antígenos, que atuam no processo de ativação de células da resposta imune adaptativa (PÉPIN et al.,1997; JACOBS, 2007; DIAS et al., 2011).

As células Natural Killer (NK), estimuladas pela IL-12 secretadas pelos macrófagos desempenham um importante papel na resposta imune do hospedeiro, fornecendo inicialmente o IFN-γ que promove o controle do crescimento bacteriano e a estimulação da resposta imune protetora. As células NK, contribuem também na destruição de células infectadas, antes que a imunidade adquirida se desenvolva. (PEPIN et al., 1994; CASSIDY et al., 2001; MCNAIR, WELSH, POLLOCK, 2007; HOPE, 2008).

Em 1999, Lan e colaboradores, investigaram o papel do receptor de complemento do tipo 3 (CR3), na defesa primária e secundária do hospedeiro contra *C. pseudotuberculosis* e concluíram que este receptor é expresso por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B e desempenham papel chave na adesão, extravasamento, migração e fagocitose. O experimento com camundongos, utilizando anticorpo monoclonal anti-CR3, resultou em multiplicação irrestrita da bactéria nos órgãos e levou ao aumento da mortalidade em camundongos infectados.

3.9.2. RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

A resposta imune do hospedeiro promovida contra *C. pseudotuberculosis* é considerada complexa, envolvendo tanto a resposta imune humoral, quanto celular (ELLIS et al., 1990), porém, o principal mecanismo imunológico contra este patógeno é a imunidade mediada por células, que ocorre por meio de dois processos distintos e complementares, a morte dos patógenos fagocitados e a lise das células infectadas (VALE, 2003).

A resposta imune humoral é uma resposta intensa que acontece em animais naturalmente infectados ou que foram imunizados. Esta resposta mediada por imunoglobulinas é regulada por citocinas produzidas devido a interação do antígeno com as células imunocompetentes. Entretanto, a resposta imune humoral, isolada, não tem a capacidade de eliminar a infecção, sendo de extrema importância quando associada à resposta imune mediada por célula. Esses anticorpos não interferem na multiplicação do patógeno, porém tem a capacidade de impedir a disseminação do mesmo, do local inicial da infecção para órgãos internos (MCINTYRE et al., 1993; VALE, 2003; MACHADO, 2004).

A defesa contra *C. pseudotuberculosis* é dependente de linfócitos T (LT), atuante na resposta imune celular, sendo esta, a mais importante no combate ao patógeno. Os LT são divididos em populações com diferentes funcionalidades, sendo elas, os linfócitos T auxiliares e os linfócitos T citotóxicos. A maioria dos linfócitos T auxiliares codifica uma proteína específica chamada CD4+, enquanto os linfócitos T citotóxicos codificam uma proteína específica denominada CD8+ (ALVES, 2007; MESQUITA JR et al., 2010).

Os linfócitos T CD4+ desempenham um papel central na função do sistema imunitário, pois ajudam as células B a produzir anticorpos e também orquestram células T CD8 e funções de macrófagos contra uma grande variedade de microrganismos patogênicos (ZHU et al., 2010).

Estas células são importantes para definir o tipo de resposta imune que será montada contra o patógeno, principalmente devido à possibilidade de

apresentar perfis distintos. Os linfócitos T CD4+ podem ser divididos em subpopulações de células, entre elas, as células T auxiliares tipo 1 (Th1) e células T auxiliares do tipo 2 (Th2) (SILVA et al., 2014).

Ao serem estimuladas, as células Th1 produzem principalmente as citocinas pró-inflamatórias IFN-γ e IL-2. Estas citocinas promovem mecanismos efetores celulares, incluindo hipersensibilidade tardia e reações inflamatórias, além de estimularem a produção de subclasses de anticorpos, como IgG2a em camundongos. Outras funções importantes são a ativação do sistema de complemento, opsonização e toxicidade mediada por células. Estes mecanismos efetores têm função de combate a patógenos intracelulares (ZHU et al., 2010; TODA; YOSHINO, 2016).

As células Th2, após estímulo, produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, as quais promovem a regulação da produção de IgG1 e IgE. As citocinas produzidas por células Th2 são consideradas mediadoras de processos alérgicos. Estas subpopulações de linfócitos T exercem um controle recíproco, uma vez que a resposta Th1 pode inibir o desenvolvimento de uma resposta Th2 e vice-versa (TODA; YOSHINO, 2016).

O desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, com a produção de IFN-γ, tem capacidade de diminuir e/ou impedir a formação de granuloma, demonstrando o potencial antifibrótico desta citocina. É sabido que o IFN-γ estimula várias quimiocinas, possivelmente capazes de diminuir a vascularização do tecido, com posterior hipóxia do granuloma e necrose caseosa (KAUFMANN, 1993; EHLERS, 2001; WYNN, 2004).

O IFN-γ exerce um papel fundamental nas respostas imunes inata e adaptativa, participando na resposta do hospedeiro às infecções bacterianas, principalmente por patógenos intracelulares, atraindo um grande número de células polimorfonucleares no sítio de replicação bacteriana. Esta citocina quando secretada por células NK, em resposta ao reconhecimento de antígenos do patógeno ou em resposta à IL-12, atua como mediadora da resposta imune inata. Quando o IFN-γ é produzido por células T em resposta ao reconhecimento

antigênico, tem ação na resposta imune adaptativa (GALVANI et al*.,* 1999; JANEWAY, 2002).

A IL-4 apresenta um papel importante na regulação da diferenciação de células T virgens após estímulo antigênico. Esta citocina induz as células T virgens a se desenvolverem em células produtoras de IL-4 e uma série de outras citocinas com potencial anti-inflamatório e/ou regulatório, entre elas a IL-5, IL-10 e IL-13. Esta citocina também suprime o aparecimento de células T CD4 produtoras de IFN-γ, promovendo em alguns casos a sobrevivência de microrganismos devido limitar a ativação de macrófagos. A IL-4 induz a proliferação de células B ativadas, células T, timócitos e clones de células NK. Esta citocina é produzida por basófilos, eosinófilos, mastócitos e pelas células Th2 (HESS, 2001; NELMS et al., 1999; CARTER et al., 2011; MOTOMURA et al., 2011).

Na regulação do processo infeccioso, a IL-10 aparece como importante componente, capaz de inibir a resposta celular através da subregulação da produção da citocina IL-12. Ela pode limitar a ativação excessiva de macrófagos e células dendríticas e, assim, regular a resposta imune danosa que ocorre nos tecidos durante as infecções (GARCIA et al., 2017).

O papel dos linfócitos T CD8+ efetores na resistência a este tipo de infecção está relacionado à capacidade de produzir IFN-γ e causar lise nas células infectadas (ARAÚJO-SOUZA et al., 2015).

3.10. SINAIS CLÍNICOS

A linfadenite caseosa é caracterizada por um processo inflamatório nos linfonodos, formando abscessos com conteúdo purulento, de aspecto caseoso e amarelado. A doença tem início com o aumento do volume dos linfonodos, que se tornam flutuantes com a progressão da enfermidade. Os linfonodos acometidos com maior frequência são os pré-parotídeos e pré-escapulares, mas,

pode ocorrer abscessos em linfonodos internos, tais como, os bronquiais, mediastínicos, pulmonares e nos mesentéricos, nestes, determinando o emagrecimento progressivo do animal (RIBEIRO, 1997; SMITH, 2002). Quando a localização do abscesso interfere nas funções de deglutição e respiração, o animal pode apresentar intolerância ao exercício, taquipnéia, dispnéia e tosse crônica (RADOSTITS et al., 2002).

A forma visceral da linfadenite caseosa apresenta maior gravidade, pois o diagnóstico clínico é muito difícil e esta enfermidade pode levar à debilidade do animal, disseminação de abscessos no organismo, condenação de vísceras e carcaça e morte de animais (RIET-CORREA, 2007; SANTA ROSA, 1996).

Em ovinos e caprinos, a palpação dos linfonodos superficiais aumentados, somados ao aspecto macroscópico dos exsudatos e a presença de febre, inapetência e emaciação são indícios da linfadenite caseosa nestes animais. A doença pode desencadear desordens reprodutivas, tais como abortos, mortalidade neonatal, diminuição de peso, atraso na maturidade sexual, redução na taxa de crescimento, diminuição na produção de lã e persistência da enfermidade no rebanho (ALONSO et al., 1992; COSTA et al., 2002; BELCHIOR et al., 2006; MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007).

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

3.11. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da linfadenite caseosa é baseado na observação macroscópica dos abscessos superficiais externos. O teste definitivo considerado como padrão-ouro, é realizado a partir do isolamento da bactéria diretamente do conteúdo caseoso dos linfonodos acometidos e cultivo

bacteriológico, seguido por testes bioquímicos do material isolado (RIBEIRO et al., 2001; OLIVEIRA, 2011; GUIMARÃES et al., 2011). O teste bioquímico utilizado para a identificação de bactérias do gênero *Corynebacterium* é o sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme lês Grottes, France). Esse método consiste de uma bateria de 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48 h. O *kit* contém 20 tubos contendo substratos que permitem testes para 11 enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase, ß-galactosidase, fosfatase alcalina, α-glucosidase, N-acetilglucosaminidase, ß-glucoronidase, redução de nitrato e hidrólise de esculina e uréia) e oito testes de fermentação de carboidratos (glucose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sucrose e glicogênio) (BAIRD; FONTAINE, 2007).

Apesar do isolamento e indentificação de *C. pseudotuberculois* ainda serem considerados “padrão-ouro” para a detecção da linfadenite caseosa, alguns autores destacam que suas restrições estão relacionadas às peculiaridades bioquímicas heterogêneas dos isolados (MUCKLE e GYLES, 1982; SONGER et al., 1988). Estes testes apresentam como desvantagem, fato de exigirem prazo longo para sua conclusão, sendo até, em vários momentos, impraticáveis, como nos casos em que muitos animais possuem somente lesões internas ou granulomas já fistulados e/ou fibrosados, não existindo *C. pseudotuberculosis* viáveis em número e qualidade suficientes para a realização dos exames (BAIRD; FONTAINE, 2007). Outra dificuldade está no momento da coleta, ao puncionar o material caseoso, pode ocorrer contaminação da pele do animal e ainda contaminação do ambiente com o pus, representando um risco na transmissão do patógeno para outros animais (BASTOS et al, 2012).

A punção aspirativa com agulha fina (PAAF) é muito útil e a citologia aspirativa pode ser usada como método diagnóstico da linfadenite caseosa no rebanho. O exame histopatológico dos linfonodos permite o diagnóstico da doença. Esta metodologia é muito importante para o diagnóstico da forma visceral. As lesões histológicas da LC se apresentam como uma área de necrose

central composta de restos celulares (RIBEIRO et al., 2001; AL-GAABARY et al., 2010; SOUZA et al., 2011).

As vantagens de se realizar a citologia das lesões por *C. pseudotuberculosis* são o baixo custo, simplicidade de execução, reduzida agressão no local da punção e a possibilidade de diagnóstico citológico acurado, em curto espaço de tempo (RIBEIRO et al., 1999). Portanto, a PAAF pode ser considerada como método prático no diagnóstico da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos (RIBEIRO et al., 2001).

Alternativamente ao cultivo de *C. pseudotuberculosis*, os testes sorológicos têm sido utilizados para o diagnóstico da LC. Dentre os testes sorológicos, o teste ELISA tem sido utilizado com muita frequência para diagnosticar a doença em rebanhos em todo mundo, pois tem a capacidade de detectar animais infectados subclinicamente, além de apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade (DERCKSEN et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2009; HOELZLE et al., 2013).

A utilização de técnicas sorológicas no diagnóstico da LC permite o controle epidemiológico da doença, podendo ser utilizado no teste de triagem ou ainda na comercialização de animais, visto que muitas vezes a doença possui caráter inaparente, tornando inviável o diagnóstico clínico e microbiológico (NASSAR et al., 2014).

Nassar et al. (2015) relataram que o ELISA indireto apresenta vantagens no diagnóstico rápido de linfadenite caseosa em ovinos quando comparada a cultura microbiológica e PCR, em termos de sensibilidade, especificidade e tempo, tenha dado a simplicidade do teste e preparação de antígeno, e também a pequena quantidade de amostra utilizada. Estes autores consideram que esta metodologia pode ser utilizada no diagnóstico da LC, no comércio de animais e, além disso, estudos de epidemiologia no Brasil.

Além da resposta imune humoral, o diagnóstico da LC também pode ser contemplado pela resposta imune mediada por células, utilizando-se um teste ELISA para quantificação da concentração do interferon-gama (IFN-γ). Esta

técnica pareceu ser mais sensível do que o ELISA convencional utilizado na detecção de anticorpos, além de não parecer ser afetada pela vacinação dos animais (PAULE et al., 2003; MENZIES; HWANG; PRESCOTT, 2004), o que poderia ser uma possibilidade para o diagnóstico desta enfermidade de forma mais precisa, se não fosse o seu elevado custo.

Meyer e colaboradores (2005) realizaram um estudo de produção de IFN-γ em cultura de sangue total que comparou cabras infectadas após estimulação com ambos os antígenos secretados e somáticos da *C. pseudotuberculosis.* Os resultados indicaram produção significativamente mais alta de IFN-γ em resposta aos antígenos secretados que aos antígenos somáticos. O IFN-γ é um marcador potencial na determinação do status infeccioso da LC em rebanhos de ovinos e caprinos. Porém, mais pesquisas devem ser realizadas para melhoria da sensibilidade do ensaio (OREIBY; HEGAZY, 2016).

A grande maioria dos programas utilizam sistemas de testes sorológicos no auxílio do diagnóstico da LC. Entretanto, a especificidade e a sensibilidade desses ensaios de diagnóstico de *C. pseudotuberculosis* muitas vezes não se revelou satisfatória. A grande desvantagem destes testes sorológicos para a aplicabilidade em diagnóstico de rotina está no fato de que os testes apresentam um desempenho adequado em caprinos, mas com sensibilidade reduzida em ovinos, especialmente nos animais subclinicamente infectados (DERCKSEN et al., 2000; BAIRD; FONTAINE, 2007; BINNS et al., 2007), além de apresentarem resultados falso-positivos, em decorrência da similaridade antigênica entre espécies do gênero *Corynebacterium*, e também não diferenciar animais vacinados dos não vacinados (ÇETINKAYA et al., 2002).

Apesar do debate científico sobre a sensibilidade e especificidade, os testes sorológicos são utilizados principalmente para o rastreio contra a linfadenite caseosa (OREIBY, 2015).

Técnicas moleculares podem ser utilizadas para o diagnóstico da linfadenite caseosa. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma alternativa aos métodos convencionais de diagnóstico, sendo mais eficiente,

reprodutível, rápida e específica (NASSAR et al., 2015). Alguns autores têm desenvolvido *primers* específicos para *C. pseudotuberculosis* que podem ser utilizados na confirmação da espécie por PCR (CETINKAYA et al., 2002; PACHECO et al., 2007; KUMAR et al., 2013; TORRES et al., 2013).

A detecção direta de *C. pseudotuberculosis* através da técnica de PCR multiplex, em amostras clínicas de animais portadores de linfadenite caseosa, representa uma possibilidade extremamente atraente para o diagnóstico desta doença, uma vez que o método padrão de diagnóstico laboratorial (isolamento bacteriano e identificação bioquímica de isolados) é extremamente trabalhoso e de custo elevado (PACHECO et al., 2007).

No estudo de Torres e colaboradores (2013) foi realizada a padronização de PCR multiplex para identificação e determinação da toxigenicidade de *C. pseudotuberculosis* e outras espécies do gênero *Corynebacterium*. Pacheco et al. (2007) padronizaram a PCR multiplex para identificação rápida de *C. pseudotuberculosis* em amostras clínicas com no mínimo 103 unidades formadoras de colônias por mililitro.

3.12. TRATAMENTO

O tratamento da linfadenite caseosa é baseado na drenagem e extirpação dos linfonodos visíveis acometidos. Apesar de *C. pseudotuberculosis* ser sensível a ampicilina, cloranfenicol, lincomicina, tetraciclina, gentamicina, penicilina, trimetropim, ciprofloxacina e sulfametoxazol, estes antibióticos não são eficazes em ultrapassar a cápsula fibrosa dos granulomas, fazendo da antibioticoterapia uma estratégia ineficaz e de alto custo. Além disso, os antibióticos não são capazes de eliminar totalmente o patógeno além de não serem aplicáveis quando linfonodos e órgãos internos já estão acometidos (WILLIAMSON, 2001; OLSON et al., 2002; ABREU et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2009).

Depois de drenar o abscesso, a ferida deve ser limpa periodicamente com solução iodada a 10% ou solução aquosa de clorexidina (WINDSOR, 2011). No entanto, Santiago e colaboradores (2013) na busca de antissépticos alternativos para o tratamento da linfadenite caseosa, realizaram testes para avaliar o efeito *in vivo* de tintura de iodo a 10% e hipoclorito a 2,5%, no interior do linfonodo e concluíram que a aplicação de tais produtos, na fase que as lesões são perceptíveis através da inspeção, não foi eficaz para seu controle.

Deve ser realizada uma rigorosa desinfecção do local onde a drenagem e antissepsia foi realizada, pois estes procedimentos podem levar à disseminação de *C. pseudotuberculosis* no ambiente (ALVES et al., 2007; ANDRADE et al., 2012). Estas bactérias podem permanecer viáveis durante meses no solo, cerca, fezes, exudato purulento, carnes congeladas, locais úmidos e escuros, tesouras, pele, entre outros, o que pode tornar sua presença constante no ambiente de criação (RADOSTITS et al., 2002; ANDERSON; RINGS; PUGH, 2005).

Nozaki et al. (2000) recomendam a extirpação cirúrgica dos piogranulomas ou linfonodos externos, caso o número de animais afetados seja pequeno, ou se relacionem a alto valor zootécnico, este procedimento cirúrgico é de baixo custo, recuperação rápida e simples realização.

3.13. CONTROLE E PROFILAXIA

A primeira medida de controle da linfadenite caseosa é impedir disseminação do patógeno no rebanho, para isso, todo material de uso comum do rebanho, como por exemplo, tosquiadeiras, tatuadores e tesouras, deve ser desinfetado antes de serem novamente utilizados. É importante que não se reutilize agulhas, seringas e outros materiais, pois estes podem servir como fômites. Outras medidas importantes a serem tomadas são, realizar o controle eficaz de insetos, desinfetar os cortes feitos durante a tosquia e o umbigo dos animais recém-nascidos com solução de iodo a 10 %, além de práticas de

manejo, tais como a limpeza e desinfecção de baias, estábulos, comedouros e bebedouros. As instalações, como estábulos, canzis e cercas devem ser construídas de forma a não provocar lesões na pele dos animais (ALVES; PINHEIRO, 1997; WILLIAMSON, 2001; COSTA, 2002; GUIMARÃES et al., 2011).

Um programa eficaz, para o controle da linfadenite caseosa, deve ser baseado também na observação clínica e sorologia periódica de todos os animais do plantel, que inclui os animais recém adquiridos e aqueles que retornaram ao rebanho. Animais introduzidos nas fazendas devem ser rigorosamente examinados antes da compra, testados sorologicamente e mantidos em quarentena, visto que muitos animais soropositivos não apresentam sinais clínicos, sendo uma importante fonte de infecção para o rebanho, o que resulta em uma alta frequência de animais apresentando abscessos após dois ou três anos. Deve ser feito o abate daqueles que apresentam sinais clínicos sugestivos de linfadenite caseosa, assim como os que são sorologicamente positivos, contudo, estes testes podem resultar na geração de falso-positivos, levando ao descarte de animais não infectados (MENZIES; HWANG; PRESCOTT, 2004; GUIMARÃES et al., 2011).

Carmo et al. (2012) demonstraram o desconhecimento dos proprietários em relação à importância econômica da presença de *C. pseudotuberculosis* nos rebanhos ovinos nacionais, assim como a necessidade de implantação de medidas eficazes de controle da linfadenite caseosa, em nível de propriedade e de fronteiras interestaduais, com o objetivo de controlar a disseminação do patógeno entre rebanhos e entre estados, além de viabilizar o fornecimento de cordeiros em quantidade e qualidade exigidas pelos mercados interno e externo.

Os programas de controle da LC devem ser baseados na educação sanitária, tanto dos proprietários de rebanho, quanto do pessoal técnico, caso isto não ocorra, o sucesso do programa pode ser comprometido. Informações sobre as perdas durante todo o ciclo de produção, assim como aquelas relacionadas ao potencial zoonótico do patógeno, devem ser fornecidas às

pessoas que trabalham com os rebanhos, seja de maneira direta ou indireta, reforçando sua importância para o sucesso do programa de controle (GUIMARÃES et al., 2011).

A forma mais importante e consistente de controlar a linfadenite caseosa é através da vacinação, aliada ao teste sorológico, como também abate ou segregação dos animais doentes, embora dispendiosas no primeiro momento, são medidas eficazes quando se deseja erradicar a enfermidade do rebanho (O'REILLY et al, 2010; WINDSOR, 2011). Vários estudos estão sendo realizados no intuito de se alcançar o desenvolvimento de uma vacina com maior eficácia protetora.

3.14. VACINAS DE PROTEÍNA RECOMBINANTE E VACINAS DE DNA

As tentativas de controle da LC usualmente implicam em imunoprofilaxia por vacinação. Desta maneira, várias estratégias vêm sendo utilizadas para desenvolver vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes, com o objetivo de gerar proteção forte e duradoura contra a LC. Entre estas estratégias, estão as vacinas de proteínas recombinantes e vacinas de DNA (COSTA et al., 2011; DROPPA-ALMEIDA et al., 2016; BRUM et al., 2017).

As vacinas de proteínas recombinantes, consideradas de segunda geração, são constituídas de antígenos purificados ou recombinantes, isolados de cultura do próprio microrganismo. As etapas de produção desta de vacina consistem no isolamento do gene, clonagem, expressão e capacidade da proteína recombinante de induzir uma resposta imune protetora no hospedeiro. Estas vacinas não se replicam no hospedeiro, portanto, não há risco de patogenicidade, além da possibilidade de produção em larga escala (HANSSON et al., 2000; MOVAHEDI e HAMPSON, 2008).

Após a administração da vacina de proteína recombinante, esta torna-se um antígeno exógeno e a resposta imune tem início a partir da endocitose,

processamento e apresentação deste antígeno, via moléculas do complexo de histocompatibilidade II (MHC de classe II) na superfície das células apresentadoras de antígenos, para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4+ auxiliares. Após serem estimuladas com o antígeno, estas células expressam diferentes citocinas. Dependendo do perfil produzido, estas células podem ser diferenciadas em duas subclasses: Th1 ou Th2. As Th1 produzem as citocinas IFN gama e IL-2, ativando os fagócitos profissionais e linfócitos T CD8+, que são os mediadores da imunidade celular. Já as Th2 produzem a citocina IL-4 agindo primariamente nos linfócitos B e auxiliam na expansão clonal e na diferenciação de linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos. Assim, linfócitos T CD4+ auxiliares exibem importante papel no desenvolvimento da resposta humoral (MOWAT e RWEYEMAMU, 1997; KOWALCZYK e ERTL, 1999; NAGATA et al., 2004).

Com a intenção de se aumentar a natureza imunoestimulatória das vacinas de proteínas recombinantes, frequentemente são utilizados potencializadores imunes chamados “adjuvantes”. Os adjuvantes são substâncias capazes de ativar reações imunes inflamatórias, aumentando a imunogenicidade destas vacinas, facilitando assim, a geração de uma resposta imune de memória (LOOK et al., 2010).

A vacina de DNA, ou de terceira geração, é baseada na tecnologia do DNA recombinante que envolve a clonagem de genes ou fragmentos de genes relacionados à virulência ou patogenicidade do microrganismo em DNA plasmidial ou em vetores virais. Este plasmídeo é inserido em uma bactéria, geralmente da linhagem *Escherichia coli*, por um processo denominado de transformação bacteriana. Ao se replicar, a bactéria possibilita que o plasmídeo seja reproduzido em grande quantidade, sendo de grande importância para a produção da vacina. Após a administração, este DNA permite a produção da proteína antigênica pelas próprias células do hospedeiro vacinado e tem a capacidade de induzir tanto uma resposta humoral, quanto uma resposta celular, com produção de células de memória imunológica, o que juntamente com a

constante produção do antígeno dentro da célula hospedeira resulta em uma resposta imune duradoura (SILVA, 1997; DONNELLY; ULMER, 1999; SANDOVAL; ERTL, 2001; SRIVASTAVA, 2003).

Antígenos processados endogenamente, ou seja, dentro do citoplasma da célula hospedeira, são fragmentados em peptídeos e estes irão interagir com sítios específicos da molécula do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC de classe I), migrando então para a superfície da célula apresentadora de antígeno, onde esse complexo ativará linfócitos T CD8+. Estas células possuem um papel importante na identificação e eliminação de células hospedeiras infectadas por patógenos intracelulares. Além disso, a proteína antigênica secretada pelas células hospedeiras transfectadas pode ser fagocitada por APCs que irão apresentá-la na superfície da célula via moléculas de MHC de classe II, para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4+ auxiliares. As células TCD4+ ativadas produzem uma cascata de citocinas que ativam células B, induzindo a produção de anticorpos (MOWAT; RWEYEMAMU, 1997; INGOLOTTI et al., 2010).

As vacinas de DNA apresentam inúmeras vantagens sobre as vacinas tradicionais em termos de segurança, facilidade de fabricação, estabilidade e imunogenicidade, entretanto, apesar das inúmeras vantagens, algumas questões têm sido levantadas com relação à segurança das vacinas de DNA, como seu potencial de integração ao genoma, o desenvolvimento de auto-imunidade, bem como a possibilidade de resistência ao antibiótico utilizado para seleção do plasmídeo em células bacterianas. Vários estudos já foram realizados e não houve a comprovação destas possíves desvantagens relacionas às vacinas de DNA (MACGREGOR, 2000; SIMMERMAM, 2002; GARMORY et al.,2005; PAL et al., 2006; SHEETS et al., 2006).

3.15. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

O sucesso da imunização por vacina de DNA depende da habilidade da entrega do material genético em sítios específicos e da melhoria da eficiência de transfecção. É altamente desejável que o sistema de entrega ou liberação possibilite um uso bem menor de plasmídeo de DNA em cada dose (ZHAO et al., 2011).

Um polímero muito utilizado como nanocarreador é a quitosana, por apresentar as características de não ser tóxico, ser biocompatível e biodegradável, além de que pode ser obtido de várias fontes na natureza e apresentar baixo custo (MACLAUGHLIN et al., 1998; TIERA et al., 2006, MAZZARINO et al., 2012). A quitosana é um polissacarídeo catiônico, derivado da desacetilação da quitina, sendo o polissacarídeo mais abundante no mundo, depois de celulose (MAZZARINO et al., 2012; AKBARI e WU, 2016). Esse polímero é catiônico devido à presença de grupamentos amina em sua cadeia polimérica que, em meio ácido, são passíveis de protonação, aumentando sua solubilidade. A quitosana interage com o DNA muito facilmente, formando nanopartículas, e tem a capacidade de conferir uma boa proteção contra a degradação por endonucleases, o que tem motivado sua utilização como vetor não viral para a terapia gênica (MAO et al., 2001; CHAE et al., 2005; BOWMAN e LEONG 2006; BOYOGLU et al., 2009; ZHAO et al, 2011; LU et al, 2014).

A determinação da eficiência de encapsulamento para a incorporação de DNA em nanopartículas é importante, porque determina a eficiência da entrega de genes e subsequente expressão de genes codificados *in vitro* e *in vivo*. A nanoencapsulação do DNA plasmidial com a quitosana é dependente de fatores tais como, a massa molecular da quitosana, densidade de carga do polímero, pH, a estrutura do polímero e do grau de desacetilação (MAO et al., 2001; BOZKIR; SAKA, 2004; YU-HONG et al., 2005).

3.16. VACINAS COMERCIAIS CONTRA LINFADENITE CASEOSA

Há no mercado duas vacinas comerciais baseadas em toxóides inativados de clostridios, visando combater a linfadenite caseosa, a Biodectin®, que possui frações inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e também outros antígenos e a Glanvac™3 que possui como componente adicional a PLD.

Uma vacina viva de *C. pseudotuberculosis*, naturalmente com baixa virulência obtida de uma amostra isolada de lesão característica de LC, foi lançada pela EBDA - Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola, em maio de 2000, denominada de 1002, contra a LC de caprinos e ovinos, a qual foi autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento para produção e comercialização em todo o território nacional. Essa vacina foi testada a campo e em laboratório e, apresentou uma eficiência de 83% (RIBEIRO et al., 1991).

3.17. VACINAS EXPERIMENTAIS CONTRA LINFADENITE CASEOSA

LeaMaster e colaboradores em 1987, realizaram ensaios de vacinação em ovinos utilizando uma cultura inativada de *C. pseudotuberculosis*, também conhecida como bacterina, esta vacina forneceu proteção imunológica aos animais desafiados com *C. pseudotuberculosis*.

Holstad e colaboradores (1989) fizeram um ensaio de vacinação em um rebanho de 247 caprinos jovens utilizando como vacina uma solução contendo o organismo inteiro do patógeno misturado com o toxóide PLD filtrado.

Eggleton et al. (1991) combinaram em uma formulação vacinal, o toxóide de *C. pseudotuberculosis* com cinco antígenos clostridianos, mostrando existir relação entre a quantidade de toxóide e a severidade dos efeitos da linfadenite caseosa em ovinos. Nesse mesmo ano, Ellis e colaboradores realizaram experimentos utilizando anticorpos neutralizantes de exotoxinas obtidas de

culturas de *C. pseudotuberculosis* conseguindo diminuir *in vitro* o crescimento da bactéria.

Walker et al. (1994) isolaram uma proteína secretada de 40 kDa, que foi nomeada de CP40. Após a purificação, este antígeno, identificado como uma serina protease, foi então utilizado como imunógeno associado a hidróxido de alumínio, e estimulou uma resposta protetora de 82% nos ovinos imunizados e reduziu em 98% as lesões nos pulmões.

Nos anos de 1997 e 1998, Simmons et al. utilizaram como formulação vacinal, em ovinos, linhagens mutantes *aroQ* e *pld* atenuados a partir das linhagens parentais C231 e TB521 de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente. Chaplin e colaboradores (1999) construíram e testaram uma versão atenuada de PLD, como formulação de vacina de DNA, na imunização de ovinos. O resultado dessa vacina foi o aumento da resposta imune humoral, gerando uma proteção parcial contra o desafio experimental de *C. pseudotuberculosis*.

Em 2007, Coelho também criou uma vacina de DNA e outra recombinante contra linfadenite caseosa, utilizando o gene *hsp60* (gene da proteína do choque térmico), entretanto, os camundongos vacinados não desenvolveram resposta imune contra linfadenite caseosa. Costa e colaboradores (2011) construíram e avaliaram em camundongos, uma vacina de DNA contra *C. pseudotuberculosis*, usando o gene *hsp60.* Os animais desenvolveram resposta humoral significativa, porém não suficiente para protegê-los contra o patógeno.

Silva e colaboradores (2014) realizaram um estudo com a proteína recombinante CP40 associada ao adjuvante saponina e obtiveram resultados satisfatórios contra a LC experimental em camundongos. Quando usada como imunógeno, a CP40r foi capaz de gerar uma resposta do tipo Th1 e conferiu uma taxa de proteção de 90% nos animais imunizados. Doppa-Almeida et al. (2016) desenvolveram uma vacina de subunidade usando a mesma proteína rCP40 de *C. pseudotuberculosis* e relataram que esta proteína recombinante foi capaz de induzir resposta imune humoral nos camundongos imunizados, além de apresentar 100% de eficácia protetora nestes animais.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology, 6ªEd. W. B. **Saunders Company**, 2008.

ABREU, S. R. O. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 502- 509, 2008.

AKBARI, A.; WU, J. Cruciferin nanoparticles: preparation, characterization and their potential application in delivery of bioactive compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 107–118, 2016.

AL-GAABARY, M.H.; OSMAN, S.A.; OREIBY, A.F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Ruminant Research**, v. 87, p. 116– 121, 2009.

AL-GAABARY, M.H. et al. Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. **Small Ruminant Research**, v.94, p.117–124, 2010.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa – Recomendações e medidas profiláticas. **Embrapa – Comunicado Técnico,** n. 33, p. 1-4, 1997.

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. Documentos, Embrapa Caprinos, Sobral. 60 p, 2007.

ALONSO, J. L. et al. The effect of experimental infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis on reproduction in adult ewes*. **Research in Veterinary Science**, v. 52, p. 267–272, 1992.

ANDRADE, J.S.L. et al. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por Corynebacterium pseudotuberculosis em caprinos e ovinos do semi-árido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 116-120, 2012.

ANDERSON, D.E.; RINGS, D.M.; PUGH, D.G. Enfermidades do Sistema Tegumentar. In: PUGH, D. G. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, p. 232-233, 2005.

ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. **Genome Biology**, v. 4, n. 2, R11-10, 2003.

APPELBERG, R. et al. Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. **Immunology**, v. 82, n. 3, p. 361–364, 1994.

ARAÚJO, C. L. D. A. et al. Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* 262 biovar *equi* isolated from cow milk. **Genome Announcements**, v.4, n. 2, 2016.

ARAÚJO-SOUZA, P. S.; HANSCHKE, S. C. H.; VIOLA, J. P. B. Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p.7, 2015.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. Corynebacterium pseudotuberculosis and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 179-210, 2007.

BASTOS, B. L. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential**. Journal of Clinical and Cellular Immunology**, 2012.doi:10.4172/2155-9899.S4-005.

BARBA, M. et al. Experimental transmission of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar equi in horses by house flies. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 636-643, 2015.

BELCHIOR, S.E. et al. Actualizacion sobre linfoadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Revista Veterinaria Argentina**, v. 23, n. 224, p. 258-278, 2006.

BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis.* **FEMS Microbioly Letters**, v. 208, p. 41-45, 2002.

BINNS, S. H.; GREEN, L. E.; BAILEY, M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 169-179,2007.

BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A. Medicina veterinária.5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 871, 1999.

BOGDAN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C.F.; ELLIS, J.A. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 299-310, 1997.

BOWMAN, K.; LEONG, K. W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, p.117-28, 2006.

BOYOGLU, S. et al. Enhanced delivery and expression of a nanoencapsulated DNA vaccine vector for respiratory syncytial virus. **Nanomedicine**, v. 5, n.4, p. 463–472, 2009.

BOZKIR, A.; SAKA, O. M. Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. **Drug Delivery**, v.11, p.107-112, 2004.

BRAVERMAN, Y. et al. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. **Revue Scientifique et |Technique**, v. 18, n. 3, p. 681-690, 1999.

BRITZ, E. et al. The relationship between Corynebacterium pseudotuberculosis biovar equi phenotype with location and extent of lesions in horses. **The Veterinary Journal**, v. 200, p. 282–286, 2014.

BROWN, C. C. et al. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to Corynebacterium pseudotuberculosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p.1116-1119, 1986.

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

CARMO, F. B. et al. Linfadenite caseosa em criações comerciais de ovinos no Distrito Federal, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.79, n.2, p. 293-298, 2012.

CARNE, H. R.; KATER, J. C.; WICKHAM, N. A toxic lipid from the surface of Corynebacterium ovis. **Nature**, v.178, n.4535, p.701-702, 1956.

CARTER, N. A. et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)**, v. 186, n. 10, p. 5569–5579, 2011.

CASSIDY, J. P.et al. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, p.46-51, 2001.

CASSAT, J. E.; SKAAR, E.P. Iron in infection and immunity. **Cell Host Microbe**, v. 15, p. 509-519, 2013.

CETINKAYA, B. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.88, p.75-83, 2002.

CHAPLIN, P. J. et al. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 6434-6438, 1999.

COELHO, K.S. Isolamento, clonagem e caracterizacao molecular do gene hsp60 de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e sua utilizacao na construcao de uma vacina de dna e de subunidade proteica. Dissertacao de mestrado em Genética, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 183 p., 2007.

COFFMAN, R. L. Origins of the T (H)1-T(H)2 model: a personal perspective. **Nature immunology**, v. 7, n. 6, p. 539–541, 2006.

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

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

COSTA, M. P. et al. 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**, v. 4, n. 1, p. 243, 2011.

CHAE, S. Y. et al. Deoxycholic acid-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for efficient gene carrier. **Journal of Controlled Release**, v 109, p. 330–44, 2005.

DERCKSEN, D. P. et al. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.167-175, 2000.

DIAS, A. A.et al. Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 3-4, p. 323–331, 2011.

DONNELLY, J. J.; ULMER, J. B. DNA vaccines for viral diseases**. Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.32, n.2, p. 215-222. 1999.

DORELA, F. A. et al. Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, p. 201-218, 2006.

DORELLA, F. A. et al. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, p. 205–213, 2009.

DROPPA-ALMEIDA, D. et al. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v.34, p.1091-1996, 2016.

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

EGGLETON, D. G. et al. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of Corynebacterium pseudotuberculosis vaccines with and without bacterial cells. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, p.317–319, 1991.

EHLERS, S. et al. Alphabeta T Cell Receptor – positive cells and interferon-g, but not inducible Nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria- induced pulmonary immunopathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, p. 1847-1859, 2001.

ELLIS, J. A. et al. Differential antibody responses to Corynebacterium pseudotuberculosis in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. Journal **of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 10, p.1609-1613, 1990.

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

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

GARMORY, H. S. et al. Antibiotic-free plasmid stabilization by operator-repressor titration for vaccine delivery by using live Salmonella enterica Serovar typhimurium. **Infection and Immunity**, v.73, n. 4, p. 2005-2011, 2005.

GARCIA, J. M. et al. Role of Interleukin-10 in Acute Brain Injuries. **Frontiers in Neurology**, v. 8, p. 244, 2017.

GERDTS, V. et al. Carrier molecules for use in veterinary vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 4, p. 596-602, 2013.

GUEDES, M. T. et al. Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 701-708, 2015.

GUIMARÃES, A. S. et al. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, v. 87, p.86-91, 2009.

GUIMARÃES, A.S. et al. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **The IIOAB Journal**, v.2, p.33-43, 2011.

HANSSON, M.; NYGREN, P. A.; STÅHL, S. Design and production of recombinant subunit vaccines. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, p. 95–107, 2000.

HARD, G.C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and Corynebacterium ovis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 5, p. 483–491, 1972.

HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of Corynebacterium ovis on peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 6, p. 1439-1449, 1975.

HESS, M. et al. Diferential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/ type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.

HOELZLE, L. E. et al. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral imune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 359-365, 2013.

HOLSTAD, G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. IX. The effect of vaccination against natural infection*.* **Acta Veterinaria Scandinavica***,* v.30, p.285-293, 1989.

HOPE, J. C.; VILLARREAL-RAMOS, B. Bovine TB and the development of new vaccines. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 77–100, 2008.

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

JAIN, S. et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmidDNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of Brucella abortus inBALB/c mice. **Vaccine**, v. 32, p. 4537-4542, 2014.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 533–547, 1995.

JANEWAY, C.A. et al. Imunologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença. Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.

JESSE, F. F. A.; SANG, S. L.; SAHAREE, A. A.; SHAHIRUDIN, S. Pathological changes in the organs of mice model inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* organism. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 1, p.145-149, 2011.

JOLLY, R. D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of Corynebacterium ovis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 189-196, 1966.

JOIN-LAMBERT, O. F. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. **The Pediatric Infectious Disease Journal.** n.25 v.9. p. 848-851. 2006.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review of Immunology**, v. 11, n. 1, p. 129–163, 1993.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. rpoB gene sequencing for identification of Corynebacterium species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3925–3931, 2004.

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

KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. Immune responses to DNA vaccines. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 55, n. 5, p. 751–770, 1999.

KUMAR, J. et al. Rapid detection of Corynebacterium pseudotuberculosis in clinical samples from sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 6, p. 1429-1435, 2013.

LAN, D. T. et al. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 42, n. 12, p. 863–870, 1998.

LAN, D. T. B. et al. Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 61, n.11, p. 1203–1208, 1999.

LEAL, I. S. et al. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5747–5754, 1999.

LEAMASTER, B.R. et al. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 869-872, 1987.

LIU, D.T. et al. An infected hydrogel buckle with Corynebacterium pseudotuberculosis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 89, p. 245–246, 2005.

LOOK, M. et al. Application of nanotechnologies for improved immune response against infectious diseases in the developing world. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.62, n.4-5, p.378-393. 2010.

LOPEZ, J. F.; WONG, F. M.; QUESADA, J. Corynebacterium pseudotuberculosis first case of human infection. **American Journal** of **Clinical Pathology**, v. 46, n. 5, p. 562-567, 1966.

LU, H. et al. Chitosan-graft-polyethylenimine/DNA nanoparticles as novel non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis. **Plos One**, v. 9, n. 1, e84703, 2014.

MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **Continuing Medical Education**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

H.Q. Mao. et al. Chitosan–DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency, **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 399–421, 2001.

MACLAUGHLIN, F. C.; MUMPER, R. J.; WANG, J. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 56, p. 259–272, 1998.

MAZZARINO, L. et al. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, p. 58-66, 2012.

MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of Corynebacterium pseudotuberculosis, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. **Microbiology**, v. 153, p. 2203-2211, 2007.

MCNAIR, J.; WELSH, M. D.; POLLOCK, J. M. The immunology of tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. **Vaccine**, v. 25, p. 5504-5511, 2007.

MACGREGOR, R.R. et al. Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/ver vaccine in HIV-infected recipients: follow up data. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, n. 1, p. 406, 2000.

MCINTYRE, T.M. et al. Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.177, p.1031-1037, 1993.

MEYER, R. et al. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 42-48, 2002.

MEYER, R. et al. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 3-4, p. 249–254, 2005.

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. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p.129–137, 2004.

MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; et al. Sistema Imunitário- parte II: Fundamentos da Resposta Imunológica Mediada por Linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secrection lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145, 1989.

MOURA-COSTA, L. F. et al. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1-2, p. 131–141, 2008.

MOTTA, R. G.; CREMASCO, A. C. M.; RIBEIRO, M. G. Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 200–213, 2010.

MOTOMURA, Y. et al. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4+ T cells. **Nature Immunology**, v. 12, n. 5, p. 450–459, 2011.

MOVAHEDI, A. R.; HAMPSON, D. J. New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 1-13, 2008.

MOWAT, N.; RWEYEMAMU, M. Vaccine manual, the production and quality control of veterinary vaccines for use in development coutries. Food and Agriculture Organization of the United Nations, n° 35, FAO. 1997.

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

NASSAR, A. F. C. et al. Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies anti-Corynebacterium pseudotuberculosis in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 116, p. 229–232, 2014.

NAGATA, T. et al. Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. **DNA and Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 93–106, 2004.

NASSAR, A. F. C. et al. Diagnostic comparison of Corynebacterium pseudotuberculosis through microbiological culture and PCR in sheep samples. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 82, p. 1-6, 2015.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8841–8848, 2000.

NELMS, K.et al. The IL-4 Receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 701-738, 1999.

NOZAKI, C. N.; FARIA, M. A. R.; MACHADO, T. M. M. Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 187–189, 2000.

OLIVEIRA, A. et al. Corynebacterium pseudotuberculosis may be under anagenesis and biovar Equi forms biovar Ovis: a phylogenic inference from sequence and structural analysis. **BMC Microbiology**, v. 16, p.100, 2016.

OLSON, M.E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 66, p. 86–92, 2002.

OREIBY, A. F. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 160–166, 2015.

OREIBY, A. F; HEGAZY, Y. M. Diagnosis of ovine caseous lymphadenitis by blood and milk gammainterferon assays. **Small Ruminant Research**, v. 144, p. 109-112, 2016.

O'REILLY, K. M., MEDLEY, G. F.; GREEN, L. E. The control of Corynebacterium pseudotuberculosis infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, p. 115-126, 2010.

PACHECO, L. G. et al. Multiplex PCR assay for identification of Corynebacterium pseudotuberculosis from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal Medical Microbiology***,* v.56, n. 4, p.480-486, 2007.

PACHECO, L. G.et al. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiology**, v.11, p. 12, 2011.

PATON, M. W. et al. The spread of Corynebacterium pseudotuberculosis infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Australian Veterinary Journal**, v.72, n.7, p.266-269, 1995.

PATON, M.et al. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, p.91–95, 2003.

PAULE, B.J. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-gamma production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting**. Veterinary Immunology and Immunopathology***,* v. 96, p. 129-139, 2003.

PAL, R. et al. Definitive toxicology and biodistribution study of a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in rabbits. **Vaccine**, v. 20,24, n. 8, p.1225-34, 2006.

PÉPIN, M.; BOISRAMÉ, A.; MARLY, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 20, n. 1, p. 111-115, 1989.

PÉPIN, M. et al. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, p. 666-670, 1994.

PÉPIN M.et al. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of Corynebacterium pseudotuberculosis differing in virulence. **Veterinary Research**, v. 28, n. 2, p. 149-63, 1997.

PEEL, M. M. et al. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis:* report of ten cases from Australia and review. **American Journal of Medicine**, n. 24 p. 185-191, 1997.

PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos Epidemiológicos da Caprinocultura Cearense. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.5, p.1-14, 2000.

PUECH, V. et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. **Microbiology**, v. 147, p.1365–1382, 2001.

QUINN, P. J. et al. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi* **In:** Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing Company, London, 1994.

RODRIGUES JÚNIOR, J. M. et al. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose?. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.30, p.468-477, 2004.

RADOSTITS O. M. et al. Doenças causadas por Bactérias. **In:** Clínica veterinária – Um tratado de doenças dosbovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos, 9.ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan S.A. p.653-656. 2002.

RIBEIRO, O. C. et al. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 461–465, 1991.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. 1ª ed. São Paulo: Nobel, 1997.

RIBEIRO, M. G. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 23–28, 2001.

RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa, p.347-352. **In:** RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS R. A. A.; BORGES J. R. (Ed), Doenças de Ruminantes e Eqüídeos. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, 2007.

RUIZ, J. C. et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. e18551, 2011.

SÁ, M. C. A. et al. Activity of disinfectants and biofilm production of Corynebacterium pseudotuberculosis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1319-1324, 2013.

SANTIAGO, L. B.et al. In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of Caseous Lymphadenitis: clinical, haematological, serological and microbiological monitoring. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 273-280, 2013.

SCHUMANN, W. Thermosensors in eubacteria: role and evolution. **Journal of Biosciences**, v. 32, p. 549-557, 2007.

SEYFFERT, N. et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research Veterinary Science***,* v. 88, n.1, p. 50-55, 2010.

SELIM A.S., Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 48, p. 241-258, 2001.

SIMMERMAN, M. Advances in DNA Vaccines. **Nurse Practitione**, v. 27, p. 53-59, 2002.

SILVA, J. W. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 965, 2014.

SILVA, W. M. et al. Label-free quantitative proteomics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates reveals differences between Biovars *ovis* and *equi* strains. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 451, 2017.

SHEETS, R. L. et al. Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts. **Toxicological Sciences**, v. 91, n. 2, p. 610–619, 2006.

SMITH, B.P. Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. 3. ed. São Paulo: Manole, p.583-584. 2002.

SNAPPER, C. M; PAUL, W. E. Interferon-γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, p. 944–947, 1987.

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

SOARES, S.C. et al. The pan-genome of the animal pathogen corynebacterium pseudotuberculosis reveals differences in genome plasticity between the biovar ovis and equi strains. **Plos One**, v.8, p. 53818, 2013.

SOUZA, M.F. et al. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.3, p.224-230, 2011.

SONGER, J. G. et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal of Veterinay Research**, v. 49, p. 223–226, 1988.

SÓSTENES, J. et al. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por Corynebacterium pseudotuberculosis em caprinos e ovinos do semi- árido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.2, p.116-120, 2012.

SPIER, S. J. et al. Use of a real-time polymerase chain reaction-based fluorogenic 5' nuclease assay to evaluate insect vectors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. **American Journal of Veterinary Research**, p. 65, n. 6, p. 829-834, 2002.

STANFORD, K. et al. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 62, p. 38–43, 1998.

SIMMONS, C.P.; HODGSON, A.L.M.; STRUGNELL, R.A. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of Corynebacterium pseudotuberculosis. **Infection and Immunity**, v.65, p3048- 3056, 1997.

SIMMONS, C. P. et al. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 474-479, 1998.

TIERA, M. J. et al. Synthesis and characterization of phosphorylcholine substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3151-3156, 2006.

TODA, T.; YOSHINO, S. Enhancement of ovalbumin-specific Th1, Th2, and Th17 immune responses by amorphous silica nanoparticles. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 408-420, 2016.

TORRES, L. F. C.et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of Corynebacterium spp with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 3, p. 272- 279, 2013.

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M. et al. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra Corynebacterium pseudotuberculosis. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 192-200, 2003.

XU, Q. et al. Structural analysis of papain-like NlpC/p60 superfamily enzymes with a circularly permuted topology reveals potential lipid binding sites. **Plos One**, v. 6, n.7, 2011.

WAGNER, K. S.et al. Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans.* **Epidemiology and Infection***,* v. 138, n. 11, p. 1519-30, 2010.

WAGNER, K. S. et al. Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000–2009. **Emerging Infectious Disease**, v. 18, p. 217–225, 2012.

WALKER, J. et al. Identification of a novel antigen from Corynebacterium pseudotuberculosis that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and Immunology**, v. 62, p. 2562-2567, 1994.

WINDSOR, P. A. Control of Caseous Lymphadenitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, n. 27, v.1, p. 193-202, 2011.

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

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. **Nature reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 583–594, 2004.

YERUHAM, I. et al. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. **Veterinary Quarterly**, v. 18, p. 87–89, 1996.

YERUHAM, I. et al. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. **Veterinary Dermatology**, v. 15, p. 315–320, 2004.

YU-HONG, L. et al. Chitosan-DNA microparticles as mucosal delivery system: synthesis, characterization and release in vitro. **Chinese Medicine**, v.118, p.936–941, 2005.

ZHAO, K. et al. Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. **Vaccine**, v. 29, p. 8549–8556, 2011.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445–489, 2010.

Manuscrito

Normas da revista Vaccine

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis* EM CAMUNDONGOS

Lais Cristina Oliveira Alvarenga[a], Lenita Ramires dos Santos [b], Marlene Barros Coelho [b], Cleber Oliveira Soares [b], Grácia Maria Soares Rosinha[b*]

[a] Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Senador Filinto Müller, nº 2443 – Caixa postal 549, Vila Ipiranga, Campo Grande - MS, Brasil.

[b] Embrapa Gado de Corte – Sanidade Animal – Laboratório de Engenharia Genética Animal, Avenida Radio Maia , nº 830, Vila Popular, Campo Grande - MS, Brasil.

[*] Autor correspondente: gracia.rosinha@embrapa.br

RESUMO

Linfadenite caseosa é uma doença infectocontagiosa, causada pela bactéria Gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis,* que acomete principalmente ovinos e caprinos. Há necessidade do desenvolvimento de novas vacinas mais eficientes contra *C. pseudotuberculosis,* entre estas, as vacinas de DNA e de proteínas recombinantes. Isto tem sido favorecido pelos estudos sobre o genoma desta bactéria e seus determinantes moleculares. Devido à magnitude da resposta imune das vacinas de DNA ser relativamente fraca, nanopartículas preparadas por biomateriais têm sido utilizadas com o intuito de aumentar a resposta imune induzidas por estas vacinas. Sendo assim, testamos a eficácia

de uma vacina de proteína recombinante e de formulações de vacinas de DNA, baseadas no gene *psec*, contra *C. pseudotuberculosis.* Este gene codifica uma proteína de membrana que está envolvida na fisiologia da bactéria e invasão de células hospedeiras. Para isto, seis grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com pcDNA*psec*; pcDNA*psec*+Quitosana; pcDNA*psec*+PSECr; PSECr-Montanide e, PBS e quitosana como controles. Após a última imunização, os animais foram desafiados com cepa virulenta de *C. pseudotuberculosis*. As vacinas pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide induziram, nos camundongos, uma forte resposta imune humoral, indicado pelos altos níveis de IgG no soro, com predominância de IgG1 no *prime-boost* e pela produção mista de IgG1/IgG2a na vacina de proteína recombinante. Estas duas vacinas também induziram uma forte resposta imune celular, evidenciada pelos níveis elevados de INF-γ produzidos por células T. Houve a produção de IL-10 estimulada por pcDNA*psec*+PSECr. Os níveis de proteção obtidos foram de 33,3% e 50% para as vacinas pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide, respectivamente. Portanto, as vacinas pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide induziram resposta imune mediada por anticorpos e células em camundongos e conferiram proteção contra infecção por *C. pseudotuberculosis*, sendo assim, consideramos estas vacinas como candidatas promissoras para o uso contra *C. pseudotuberculosis*.

Palavras-Chave: Linfadenite caseosa, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, vacina de proteína recombinante, vacina de DNA, quitosana.

1. Introdução

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, parasito intracelular facultativo, pleomórfico, não esporulado, não encapsulado e imóvel [1], sendo o agente causador da linfadenite caseosa (LC) principalmente em ovinos e caprinos [2,3], mas pode acometer uma grande variedade de mamíferos, incluindo bovinos, bubalinos, suínos, equinos, camelos e seres humanos [1].

A LC é caracterizada pela presença de necrose caseosa nos gânglios linfáticos ou a formação de abcessos nos nódulos linfáticos e tecidos subcutâneos superficiais [4], podendo acometer também órgãos viscerais como pulmões, rins, fígado e baço [5]. Esta enfermidade tem causado grande impacto nos criatórios de ovinos e caprinos e significativos prejuízos em decorrência do comprometimento da carne, lã, leite e pele [4].

Linfadenite caseosa é uma doença difícil de erradicar, devido a terapia com drogas não ser eficaz e a detecção clínica de animais infectados apresentar eficiência limitada [6]. Portanto, o controle desta doença deve estar baseado em medidas que possam inibir a entrada e disseminação de *C. pseudotuberculosis* no rebanho. A identificação e remoção de animais infectados é um fator chave para o sucesso das medidas de controle da LC e a vacinação de animais é outra estratégia amplamente recomendada para o controle desta enfermidade [5].

Várias estratégias vêm sendo testadas com o propósito de obter uma vacina protetora e mais segura contra a linfadenite caseosa, entre elas, as vacinas de proteínas recombinantes e vacinas de DNA. Ambas apresentam potencial protetor sem riscos de causar a doença e induzem resposta imune humoral e celular [7,8]. Além disso, as vacinas de DNA têm outras vantagens como estabilidade, baixo custo de produção e não precisam de refrigeração [8].

Nanopartículas de quitosana têm sido avaliadas como carreadora para várias formulações de DNA [9]. Esta, por ser um polímero biodegradável possui a vantagem de prevenir o seu acúmulo nas células, se sucessivas administrações forem necessárias, além de apresentar reduzida toxicidade. A

degradação do polímero é essencial para a liberação do DNA dentro do citosol. Entretanto, outra característica que torna a quitosana um material promissor para a liberação de DNA é que essa liberação é lenta, de longo prazo [10].

Em um projeto desenvolvido por este grupo de pesquisa, foram identificados alguns genes com potencial antigênico, a partir de imunovarredura de uma biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis* (dados submetidos à publicação), entre eles, o gene *psec*, que codifica uma proteína de membrana, que ainda não apresenta função bem definida em *C. pseudotuberculosis*. Estudos realizados com outras bactérias indicam que as proteínas da superfamília PSEC são importantes na fisiologia bacteriana e estão envolvidas no crescimento, desenvolvimento, divisão celular, maturação da parede celular e também virulência [11,12].

Considerando o potencial antigênico do gene *psec*, objetivou-se com este estudo avaliar a imunoproteção, em camundongos BALB/c, das vacinas de proteína recombinante, PSECr e, DNA, pcDNA*psec,* associada e não associada à nanopartículas de quitosana e, com *prime-boost* com a PSECr.

2. Materiais e métodos

2.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento

Escherichia coli TOP 10 F', BL21 DE3 ou DH5α foram utilizadas para clonagem, armazenamento e expansão plasmidial. *Escherichia coli* Rosetta-gami foi utilizada para expressão do gene *psec* e posterior obtenção da proteína

recombinante. As linhagens de *E. coli* foram crescidas em meio Luria- Bertani líquido (LB) e LB ágar a 37 ºC por 16 horas. Cepas de *E. coli* Rosetta-gami foram cultivadas em meio 2YT líquido, seguindo as mesmas condições de crescimento das outras cepas de *E. coli*. As cepas de *C. pseudotuberculosis* foram crescidas em caldo de infusão cérebro e coração (BHI) por 48 horas a 37 ºC.

2.2. Camundongos e ética na experimentação animal

Camundongos BALB/c fêmeas, de seis a oito semanas de idade, foram obtidos do biotério da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Antes dos testes, os camundongos foram aclimatados em condições controladas (21± 2 ºC e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro), recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Após o período de aclimatação, foram agrupados randomicamente e identificados.

Todos os protocolos experimentais deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Corte, sendo certificado com o protocolo nº 017/2014.

2.3. Construção plasmidial

O gene *psec*, que codifica um produto de 867 pares de base, foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos.

A PCR foi realizada utilizando 100 ng de DNA em uma reação de 20 µL

contendo tampão 10X, 1,5mM de $MgCl_2$, 0,5mM de dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase. A amplificação foi realizada a partir de 94 ºC durante 2 minutos para desnaturação inicial e 34 ciclos consistindo em 94 ºC durante 30 segundos para desnaturação, 56 ºC por 45 segundos para anelamento dos oligonocleotídeos, 72 ºC durante 1 minuto para extensão, além de 72 ºC durante 10 minutos para extensão final.

O produto amplificado pela PCR e o vetor pcDNA™3.1(+) (Invitrogen®) foram clivados com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI (New England BioLabs®). Estes foram purificados com *QIAEX II Gel Extraction Kit* e ligados com T4 DNA Ligase (Promega®). Posteriormente, o plasmídeo recombinante foi inserido em células competentes *E. coli* DH5α, e uma colônia recombinante foi selecionada. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *Wizard miniprep*™ (Promega®) e confirmado por sequenciamento automático e clivagem enzimática com *Bam*HI e *Eco*RI (New England BioLabs®).

Para produção e purificação do plasmídeo pcDNA*psec*, este foi introduzido em *E. coli* DH5α competentes, e colônias isoladas foram cultivadas em meio LB líquido. O plasmídeo pcDNApsec foi purificado usando o kit *EndoFree Giga* (Qiagen®) seguindo recomendações do fabricante. A qualidade e concentração do DNA plasmidial foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop® e por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *Sybr Gold* (Invitrogen®) e visualizado em transiluminador ultravioleta. O plasmídeo foi diluído em solução fosfato salina estéril para a concentração final de 1 µg/µL.

2.4. Preparação de DNA/nanopartículas

A vacina de DNA, pcDNA*psec*, foi preparada em nanopartículas de quitosana usando o método de coacervação complexa, conforme a metodologia descrita por Mao et al. [13]. Brevemente, uma solução de quitosana (0,02% em acetato de sódio 5mM, pH 5,5) e uma solução do pcDNA*psec* a 100µg/µLem sulfato de sódio 10mM foram pré-aquecidas em banho-maria a 55 ºC, separadamente. A solução de quitosana (250 µL) foi gotejada sobre a solução contendo o plasmídeo (250 µL) e, rapidamente homogeneizada em vórtex por aproximadamente um minuto. O volume final da mistura em cada preparação foi limitado a 500 µL a fim de produzir nanopartículas uniformes. A solução foi reservada até alcançar temperatura ambiente e após, estocada à 4 ºC. A formulação pcDNA*psec* complexada à nanopartículas de quitosana, denominada pcDNA*psec*+Quitosana, foi utilizada para o estudo de imunização sem purificação adicional.

2.5. Ensaio de proteção do DNA encapsulado por quitosana

A formulação pcDNA*psec* e pcDNA*psec*+Quitosana, ambos na concentração de 1µg de DNA, e a solução de quitosana a 0,02% foram incubados com DNAse I (1U), por 30 minutos a 37 ºC. A integridade de pcDNA*psec* e pcDNA*psec*+Quitosana foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com Sybr gold e visualizado em transiluminador ultravioleta.

2.6. Avaliação da eficiência de encapsulação (EE)

A quantidade de pcDNA*psec* encapsulado nas nanopartículas foi calculada medindo-se a diferença entre a quantidade total de DNA adicionado no tampão de preparação de nanopartículas e a quantidade de DNA não encapsulado restante na suspensão aquosa após o processo de coacervação. Para este fim, a suspensão de nanopartículas foi centrifugada a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, determinando-se seu volume, o qual foi utilizado no cálculo da EE.

Determinou-se a concentração do DNA no sobrenadante utilizando o Nanodrop (absorbância em 260 nm). Esta determinação foi feita em triplicata para que fossem calculados a média (M) e o desvio padrão (SD). A EE foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\%\ \mathrm{EE}\ = \frac{\big((\mathrm{MP}) - (\mathrm{M}\,.\,\mathrm{S})\big).\,100}{\mathrm{MP}}$$

Onde:

EE = eficiência (%) de encapsulação;

MP = Massa total do plasmídeo;

M = média (ng µL-1) da concentração do plasmídeo no sobrenadante;

S = volume (µL) do sobrenadante retirado após a centrifugação.

2.7. Detecção da expressão do gene *psec*, *in vivo*, por RT-PCR

Para realização da avaliação da expressão *in vivo* do gene *psec*, um grupo, contendo três camundongos fêmeas BALB/c, recebeu 100 µg do pcDNA*psec*+Quitosana, via intramuscular. Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, no período entre 24, 144 e 360 horas após a inoculação.

Os músculos de cada camundongo, onde foi injetada a vacina pcDNA*psec*+Quitosana, foram coletados para a extração de RNA total. As amostras foram extraídas com o reagente trizol, segundo as recomendações do fabricante. Após a extração do RNA, este material foi tratado com a enzima *Amplification grade* DNAse I (Invitrogen) e realizada a transcrição reversa do RNA para cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa do sistema ImProm-II Reverse Transcription System (Promega®). Em seguida, o cDNA foi amplificado pela técnica da PCR.

2.8. Expressão gênica e purificação da proteína recombinante

O gene *psec*, confeccionado sinteticamente pela empresa de biotecnologia *Genone Biotechnologies*, e ligado em plasmídeo de expressão gênica em procariotos pET-47b (+) (Novagen®), foi introduzido em *E. coli* TOP10 F' quimicamente competente, para obtenção de estoque e cultivo. O sequenciamento para confirmação da construção plasmidial foi realizado e fornecido pela empresa. O cultivo da cepa estoque foi realizado em meio 2YT

líquido, para extração e purificação do plasmídeo recombinante pET47b*psec* com o kit *Wizard miniprep*™ (Promega®).

Escherichia coli Rosetta-gami, quimicamente competente, foi transfomada com o plasmídeo recombinante pET47b*psec* e a indução da expressão gênica foi realizada em meio 2YT líquido, com adição de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 1 mM, por incubação a 37 °C, por 4 horas.

A proteína PSECr foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel (ProBond Purification System, Invitrogen) e, em seguida, dializada contra PBS por 72 horas, a 4 ºC. A qualidade da purificação foi verificada em gel SDS-PAGE 12%, corado com azul de *comassie* e a avaliação da antigenicidade da proteína recombinante foi realizada por meio de *Western blotting*. Para avaliação da quantidade obtida de proteína foi utilizado o Qubit™ Fluorometer (Invitrogen), conforme orientações do fabricante. A proteína purificada foi estocada a -20º C, para uso como vacina de proteína recombinante, assim como *booster* após administração da vacina de DNA e como antígeno nos testes de ELISA.

2.9. SDS-PAGE e *Western blotting*

A proteína PSECr foi separada em várias canaletas por gel SDS-PAGE 12%, durante 1 hora e 40 minutos a 110V e visualizada por coloração com *Coomassie Blue* R-250. Posteriormente, foi transferida para membrana de nitrocelulose a 70 volts, durante 1 hora e 15 minutos a 4º C. A eficiência de

transferência foi avaliada pela coloração de Ponceau e as membranas com PSECr foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em 0,05% de PBS-Tween 20, durante 1 hora e 15 minutos, a 37 ºC, sob agitação. As membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% e incubadas separadamente com o anticorpo monoclonal anti-histidina (Sigma-Aldrich®) na diluição 1:3000 e, com soros de ovino e caprino naturalmente infectados com *C. pseudotuberculosis* e soro de caprino negativo, na diluição 1:25, 1:100 e 1:100, respectivamente.

Decorrido o tempo, foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween a 0,05% e as membranas foram incubadas com o anticorpo Anti-Camundongo IgG-peroxidase (Sigma-Aldrich®), na diluição 1:3000, para identificação da ligação dos anticorpos específicos à proteína recombinante que contém resíduos de histidina em sua porção N-terminal. As membranas incubadas com soros de ovinos e caprino foram submetidas à incubação com anticorpo secundário Anti-Goat/Sheep IgG-Peroxidade (Sigma-Aldrich®) na diluição 1:5000. Bandas reativas foram reveladas utilizando 0,6 mg/mL de diaminobenzidina (DAB) dissolvido em solução contendo Tris-Hcl 50mM, $NiSO_4$ 0,3% e 1,5 µL/mL de peróxido de hidrogênio e paralisadas por meio da lavagem das membranas em água bidestilada.

2.10. Imunização, desafio e análise de proteção vacinal

Camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, foram divididos em 6 grupos contendo dez integrantes cada. Os grupos foram

denominados da seguinte maneira: PBS, Quitosana, pcDNA*psec*, pcDNA*psec*+Quitosana, pcDNA*psec*+PSECr (*prime-boost*) e PSECr. Como adjuvante da proteína PSECr, foi utilizado o *Montanide ™ ISA 61 VG* (Seppic) e o preparo da emulsão foi de acordo com Miles et al. [14].

Os camundongos dos grupos pcDNA*psec* e pcDNA*psec*+Quitosana foram inoculados com três doses, de 100 µg cada, por via intramuscular. Os animais do grupo da vacina PSECr receberam três doses de 50 µg da proteína, emulsionada ao adjuvante Montanide, por via subcutânea. Os camundongos do grupo pcDNA*psec*+PSECr receberam 2 doses de vacina pcDNA*psec* intramuscular e um reforço subcutâneo com 50 µg de PSECr. Os animais dos grupos PBS e Quitosana receberam três doses de 100 µL, via subcutânea, de seus respectivos controles. As três imunizações foram realizadas em intervalos de 15 dias.

Após 23 dias da última imunização, seis animais de cada grupo foram desafiados com $1x10^6$ UFC da cepa virulenta CP 28033 de *C. pseudotuberculosis*, por via intraperitoneal e monitorados diariamente por 30 dias, para avaliar a presença e gravidade dos sinais clínicos de doença ou mortalidade. Os quatro animais restantes de cada grupo foram eutanasiados e encaminhados para esplenectomia, para obtenção de esplenócitos e avaliação da resposta imune celular. Ao fim do período de monitoramento, os animais desafiados com a cepa virulenta foram eutanasiados e necropsiados para observação da presença, ou não, de lesões sugestivas de linfadenite caseosa.

Amostras de sangue, dos 10 animais de cada grupo, foram coletadas por

punção do plexo retro-orbital um dia antes de cada imunização e um dia antes do desafio. Os soros obtidos foram congelados a -20 ºC, para posterior análise nos ensaios de imunoadsorção enzimática.

2.11. Determinação da resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada pela produção de IgG total específico e níveis das subclasses IgG1 e IgG2a, por meio de um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). Foi realizada, anteriormente, uma padronização do teste ELISA indireto para a proteína recombinante, na qual as concentrações ótimas de antígenos e diluições de soro foram determinadas por titulação cruzada.

A proteína PSECr purificada (2,5 µg/mL), previamente solubilizada em SDS 2%, foi utilizada como antígeno e adsorvida em placas de poliestireno de 96 poços (Costar® 3590), sendo aplicado 100 µL/poço da proteína diluída em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6, as placas foram incubadas em câmara úmida a 4 ºC por 16 horas.

Para detecção de IgG total, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween 20 (PBS-T) a 0,05% e bloqueadas com 200 µL/poço de leite em pó desnatado a 5%, diluído em PBS-T, por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens com PBS-T, foram adicionados em duplicata, 100 µL/poço de cada soro (1:100). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, e posteriormente lavadas com

PBS-T. O conjugado Anti-Mouse IgG-Peroxidade (Sigma-Aldrich®) na diluição 1:10.000, foi utilizado, seguido de incubação por 1 hora a 37°C.

Para a avaliação das subclasses IgG1 e IgG2a, as placas sensibilizadas anteriormente com PSECr foram bloqueadas por duas horas, em temperatura ambiente, com 200 µL/poço de PBS-T/soro fetal bovino 10% (PBS-T/SFB). Após lavagens com PBS-T, foi adicionado 100 µL/poço de cada soro (1:100) em duplicata ou em diluição seriada (determinação de títulos). As placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente lavadas com PBS-T. Foram utilizados os anticorpos Anti-IgG1 e Anti-IgG2a (BD Biosciences®) diluídos a 1:1000 em PBS-T/SFB e as placas incubadas por duas horas, após este tempo foram realizadas lavagens com PBS-T, seguido de incubação com Avidina Peroxidase (Sigma-Aldrich®) (1:2000 em PBS-SFB) por 45 minutos em temperatura ambiente.

As reações enzimáticas foram reveladas com adição de 95 µL/poço do cromógeno/substrato (OPD) (Sigma-Aldrich®), diluído segundo instruções do fabricante. Em seguida, as placas foram incubadas por 20 minutos ao abrigo da luz, sendo a reação colorimétrica interrompida pela adição de H_2SO_4 a 2,5 N. A densidade óptica (DO) foi lida com absorbância de 490 ηm em espectrofotômetro.

A linha de corte foi determinada de acordo com Frey et al. [15]. O título de cada soro foi calculado como a recíproca da maior diluição do soro produzindo uma densidade óptica específica superior à linha de corte.

2.12. Avaliação da resposta imune celular

Vinte e oito dias após a imunização final, quatro camundongos de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical e esplenectomizados assepticamente, para obtenção dos esplenócitos e posterior avaliação da resposta imune mediada por células.

Suspensões celulares de esplenócitos foram preparadas para cada animal em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM 1-glutamina e gentamicina (10µg/mL). Os esplenócitos obtidos foram cultivados a $2x10^6$ células por poço, em placas de 24 poços e estimulados com 5 µg/mL da proteína recombinante PSECr. Concanavalina A foi usada na concentração de 5 µg/mL como controle positivo de estimulação linfocitária. O meio RPMI suplementado, sem nenhum agente estimulante, foi utilizado como controle negativo. Os estímulos PSECr, Con A e o meio RPMI foram previamente tratados com polimixina B (10 µg /mL), por 30 minutos, em agitação constante. As culturas foram incubadas por 48 horas a 37 ºC em atmosfera úmida (5% de CO_2). Ao fim da incubação, os sobrenadantes das culturas foram aliquotados e estocados a -20°C. Os sobrenadantes foram utilizados para determinação da concentração de interferon-gama (IFN-γ) e interleucina 10 (IL-10) nas culturas de esplenócitos de cada animal. A detecção/quantificação das citocinas foi realizada utilizando um sistema de ELISA de captura comercial (BD Biosciences®), seguindo recomendações do fabricante, diferenciando apenas no uso do cromógeno que foi o SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich®). A

densidade óptica foi lida com absorbância de 490 nm em espectrofotômetro.

2.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio dos testes de análise de variância (ANOVA), testes de Tukey (com $p<0,05$ quando houve diferença significativa) e Sidak (com $p< 0,0001$ quando houve diferença significativa) para avaliação da diferença entre os grupos, dos resultados dos ELISAS indiretos e dos ELISAS de captura. Os dados foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism*, versão 6 para o Windows (GraphPad®).

3. Resultados

3.1. Produção do plasmídeo vacinal pcDNA*psec*

A construção do plasmídeo vacinal pcDNA*psec* foi confirmada por sequenciamento automático (dados não mostrados) e submetida a digestão dupla com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, liberando um fragmento de 867 pares de bases, correspondente ao gene *psec* e 5428 pares de base referente ao plasmídeo pcDNA3.1+ (Figura 1).

3.2. Eficiência de encapsulação (EE) e proteção do pcDNA*psec* encapsulado

Nanocomplexos de pcDNA*psec*+Quitosana foram obtidos como resultado da coacervação complexa entre quitosana e DNA plasmidial, com a

obtenção de 100% de eficiência de encapsulação.

O efeito da proteção da degradação por DNAses do pcDNA*psec* encapsulado por quitosana, foi analisado usando-se DNAse I. Como se pode observar na figura 2, pcDNA*psec*+Quitosana foi efetivamente protegido contra a degradação por DNAse I, enquanto o pcDNA*psec* não encapsulado sofreu degradação por esta enzima. Estes resultados indicam que pcDNA*psec*+Quitosana foi preparado e obtido com excelente EE e com resistência à DNAse.

3.3. Avaliação RNA mensageiro do gene *psec in vivo*

A presença do RNAm foi observada *in vivo* por meio da RT-PCR para o pcDNA*psec*+Quitosana, demonstrando a eficiência do funcionamento do plasmídeo vacinal em células eucarióticas (Figura 3).

3.4. Expresão gênica de *psec*, purificacação de PSECr e *Western blotting*

A expressão gênica de *psec* para a síntese da proteína (PSECr) foi realizada em meio 2YT líquido, a 37º C, por 4 horas, sendo induzida com 1mM de IPTG quando as células em crescimento atingiram uma densidade óptica de 0,4A a 600 ηm (Figura 4A). A proteína PSECr foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de níquel e apresentou o peso molecular esperado de 31 Kilodaltons (kDa) (Figura 4B), sendo confirmada por eletroforese em SDS-PAGE 12% e *Western blotting* contra o anticorpo monoclonal anti-histidina (Figura 4C).

Além disso, pode-se observar na figura 4C, que os soros de ovino e caprino naturalmente infectados com *C. pseudotuberculosis* reconheceram a proteína PSECr, exceto o soro negativo de caprino. Os resultados referentes ao reconhecimento da proteína por anticorpos do isotipo IgG de ovino e caprino naturalmente infectados com *C. pseudotuberculosis* demonstram a antigenicidade da PSECr.

3.5. Avaliação da resposta imune humoral

Para a avaliação da produção de IgG e seus isotipos, IgG1 e IgG2a, foi realizada a técnica de ELISA indireto, tendo como antígeno a proteína recombinante PSEC. Para analisar a progressão da indução de IgG nos animais dos grupos, foram realizadas coletas de sangue, para obtenção dos soros, nas pré-imunizações (dias 0, 15 e 30) e no pré-desafio (dia 47), totalizando quatro coletas.

Analisando a cronologia das imunizações (Figura 5), observou-se que a partir do dia 30, houve um significativo aumento na produção de IgG total nos animais imunizados com a vacina PSECr-Montanide; a comparação entre as médias dos valores de densidade óptica dos animais deste grupo, em relação aos animais dos grupos testes e grupos controles, evidenciou que houve diferença estatística significativa referente à produção de anticorpos ($p<0,05$).

No dia 47, os animais imunizados com PSECr-Montanide ainda se destacavam com altos níveis de produção de IgG total ($p<0,05$), em relação aos

animais dos demais grupos. Neste mesmo período, os animais imunizados com a vacina pcDNA*psec*+PSECr apresentaram diferença significativa ($p<0,05$), em comparação aos demais grupos. Não foram identificados níveis de IgG total significativos nos animais imunizados com pcDNA*psec* e pcDNA*psec*+Quitosana e nos animais dos grupos controles PBS e Quitosana.

Sendo assim, os animais imunizados com pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide foram selecionados para titulação dos isotipos de IgG. Foi observado que estas vacinas foram capazes de induzir uma produção significativamente maior ($p<0,05$) de IgG1 e IgG2a, nos camundongos, quando comparadas ao PBS, 47 dias após a primeira imunização (Figura 6).

Os animais imunizados com pcDNA*psec*+PSECr apresentaram diferença significativa ($p<0,0001$) na produção de IgG1 e IgG2a, apresentando uma resposta imune com predominância do isotipo IgG1. Já nos animais imunizados com PSECr-Montanide houve uma resposta mista das subclasses de IgG, não sendo observada diferença significativa entre os títulos de IgG1 e IgG2a. Não houve diferença significativa ($p<0,05$) na produção de IgG1 e IgG2a entre os grupos de animais imunizados com a vacina pcDNA*psec*+PSECr e os que receberam a vacina de proteína recombinante, PSECr.

3.6. Resposta imune mediada por células nos camundongos imunizados

A técnica de ELISA de captura foi utilizada para determinar a concentração das citocinas IFN-γ e IL-10, utilizando o sobrenadante da cultura de esplenócitos, que foram anteriormente estimulados com a proteína PSECr.

Pela análise dos resultados, demonstrou-se que as formulações vacinais pcDNA*psec*+PSECr e PSECr emulsionado ao adjuvante Montanide, foram capazes de induzir uma produção significativamente maior de IFN-γ quando comparada às demais formulações e o controle ($p<0,05$) (Figura 7). Houve ainda diferença estatística significativa ($p<0,05$) de IL-10 induzida por pcDNA*psec*+PSECr em relação às demais formulações vacinais e controles.

3.7. Avaliação da eficiência da proteção vacinal após desafio

Animais imunizados com as formulações vacinais pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide foram parcialmente protegidos contra infecção experimental por *C. pseudotuberculosis*, apresentando uma taxa de sobreviventes de 33,3% e 50%, respectivamente (Figura 8). Ao fim do período de observação (30º dia), nenhum dos sobreviventes apresentaram sinais clínicos de linfadenite caseosa, tais como inapetência, piloereção, desidratação e apatia. Na necropsia destes animais, não foi observada a presença de alterações macroscópicas nos órgãos.

O grupo pcDNA*psec* apresentou um animal sobrevivente no 30º dia de observação (16,6%). Não foram observados sinais clínicos e lesões macroscópicas de LC neste animal.

O grupo pcDNA*psec*+Quitosana e o grupo controle quitosana apresentaram dois sobreviventes cada (33,3%), sem alterações clínicas e anatomopatológicas características de infecção por *C. pseudotuberculosis*.

A partir do 7º dia, animais do grupo controle PBS começaram a morrer, não havendo integrantes ao final do período de monitoramento. Na necropsia foi observado que os animais apresentavam esplenomegalia e abscessos em diversos órgãos, principalmente, baço, rins e fígado (Figura 9).

4. Discussão

Diferentes vacinas têm sido investigadas com o objetivo de gerar uma resposta imune eficaz e protetora contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, entre elas, as vacinas de DNA [16] e vacinas de proteínas recombinantes [17].

Neste estudo quatro diferentes estratégias de vacinas foram utilizadas na imunização de camundongos BALB/c para investigar a imunogenicidade e eficácia protetora da proteína de membrana PSEC de *C. pseudotuberculosis*: pcDNA*psec*, pcDNA*psec*+Quitosana, pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide.

O modelo murino escolhido para o desenvolvimento deste estudo foi camundongo BALB/c, devido esta linhagem ser susceptível a infecção experimental com *C. pseudotuberculosis.* Estes animais também são de fácil manejo e apresentam linhagens isogênicas com diferentes capacidades de resposta imune. Ademais, a infecção experimental com *C. pseudotuberculosis*

em camundongos reproduz os principais aspectos clínicos e anatomopatológicos observados em pequenos ruminantes [18].

Neste estudo, a vacina de DNA, pcDNA*psec* não foi capaz de induzir níveis significativos de IgG e das citocinas IFN-γ e IL-10 e demonstrou baixa eficiência protetora contra *C. pseudotuberculosis* (16,6%). O grupo apresentou apenas um camundongo sobrevivente ao final do período de observação; este animal não apresentava sinais clínicos de LC e na necropsia não foram observados abscessos sugestivos da doença. Estes resultados corroboram com os dados obtidos por Brum et al. [19], onde o gene cp09720 de *C. pseudotuberculosis*, usado como vacina de DNA, não foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a e conferiu baixa proteção nos animais desafiados (16,6%). Porém, diferentemente dos nossos resultados, pTARGET/cp09720, foi capaz de induzir significante produção de IFN-γ, que provavelmente está relacionado com a taxa de proteção.

A imunização de camundongos com a vacina de DNA contendo o gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*, também não conferiu proteção aos animais desafiados, entretanto, foi capaz de induzir uma produção significativa de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a [16].

Devido ao fato das vacinas de DNA apresentarem imunogenicidade relativamente baixa, várias estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar sua eficácia. Entre elas, a otimização do plasmídeo, otimização de códons, melhoria nos sistemas de entrega de antígeno e as vias de imunização, uso de

adjuvantes, co-expressão de adjuvantes moleculares e estratégia *prime-boost* [20].

Entre os sistemas de administração de antígenos, as nanopartículas preparadas por biomateriais podem oferecer várias vantagens em relação a outros sistemas de entrega [21]. Por exemplo, elas podem proteger o antígeno contra a degradação *in vitro* e *in vivo*; limitar a distribuição sistêmica, reduzindo a dose e os prováveis efeitos colaterais; além de melhorar a captação e apresentação do antígeno, resultando em aprimoramento de respostas imunes adaptativas [22].

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, biodegradável, biocompatível e com baixa toxicidade [23]. As nanopartículas baseadas em quitosana têm potencial para atuar como sistema de entrega de vacinas de DNA e para proteger contra a degradação biológica por nucleases [9].

Em nossos estudos, a nanopartícula de quitosana não foi capaz de aumentar de maneira significativa a imunogenicidade da vacina pcDNA*psec*; é possível que tenha ocorrido alguma deficiência neste sistema de entrega do DNA plasmidial, como a baixa apresentação do antígeno ao sistema imune do hospedeiro. Porém, o grupo pcDNA*psec*+Quitosana e o grupo controle que recebeceu apenas a quitosana, apresentaram dois animais sobreviventes cada (33,3%) no 30º dia; estes animais estavam sadios e na necropsia não apresentaram lesões macroscópicas nos órgãos. Na avaliação da resposta celular induzida por pcDNA*psec*+Quitosana, foi detectada a citocina IFN-γ, que

mesmo em baixos níveis biológicos, pode ter sido capaz de gerar imunoproteção aos animais.

Não está claro o motivo da vacina pcDNA*psec*+Quitosana não ter induzido resposta imune nos camundongos, uma vez que o RNAm foi detectado *in vivo* por meio da RT-PCR, demonstrando a eficiência do funcionamento do DNA plasmidial em células eucarióticas. Uma possível explicação seria que a transfecção e expressão gênica, *in vivo*, não foi eficiente, induzindo baixos níveis de anticorpos e citocinas nestes animais.

Uma opção de melhoria nos sistemas de entrega de antígenos, seria o co-encapsulamento adicional com moléculas imunoestimulatórias, como os oligonucleotídios CpG, saponinas e citocinas, com a propósito de aumentar a capacidade total do adjuvante, levando à resposta imune específica melhorada contra antígenos [24]. As moléculas imunoestimulatórias são direcionadas aos receptores específicos, tais como receptores tipo Toll (TLRs) e têm a capacidade de desencadear respostas imunes mais fortes [25].

As vacinas de DNA são consideradas econômicas e têm a vantagem de induzir ambas respostas imune humoral e celular, no entanto, como a eficácia *in vivo* das vacinas gênicas nem sempre é satisfatória [26], outra estratégia utilizada para melhorar sua imunogenicidade é o *prime-boost* [27], onde são realizadas doses de vacina de DNA, seguido de reforço com vacina de proteína recombinante.

Neste estudo, a vacina pcDNA*psec*+PSECr induziu a produção de altos níveis de IgG1 e IgG2a nos camundongos, com tendência a resposta do tipo

Th2, indicada pela predominância do isotipo IgG1. Nossos achados diferem dos resultados observados em outros estudos, onde camundongos que receberam a estratégia *prime-boost* tiveram uma maior produção de anticorpos do isotipo IgG2a [27, 28]. O tipo de vacina, o uso de adjuvante, a via de imunização, ou ainda, a própria natureza do antígeno, podem ter direcionado o perfil de resposta imune.

A imunidade contra patógenos intracelulares requer mecanismos mediados por células. Respostas do tipo Th1, caracterizadas pela produção de IFN-γ, é essencial para conferir imunidade protetora contra infecção por *C. pseudotuberculosis* [29]. Células Th2 são capazes de produzir IL-10 que estimulam também a diferenciação de células B em plasmócitos para produzirem IgG1, favorecendo assim o desenvolvimento da resposta imune humoral. A presença de IL-10 também pode resultar no bloqueio da ativação de macrófagos, a partir do impedimento da atuação do IFN-γ [30].

A vacina pcDNA*psec*+PSECr foi capaz de induzir a produção significativa das citocinas IFN-γ e IL-10. No entanto, a produção de IL-10 induzida por pcDNA*psec*+PSECr foi menor que a produção de IFN-γ, não justificando a produção de IgG1 ser maior que a produção de IgG2a, neste grupo. Uma possível explicação seria que alguma outra citocina de resposta Th2, que não foi mensurada neste estudo, tenha atuado nas células B, aumentando então os níveis de IgG1.

Quanto à proteção, as vacinas pcDNA*psec*+PSECr e PSECr emulsionada ao adjuvante Montanide demonstraram capacidade imunoprotetora de 33,33% e

50%, respectivamente; sendo que os animais não apresentaram sinais clínicos e/ou lesões sugestivas de LC ao final do período de monitoramento. Diferentemente do que aconteceu com os animais do grupo controle PBS, que não apresentou sobreviventes ao fim do período de monitoramento.

O potencial protetor da vacina PSECr-Montanide provavelmente está associado aos altos níveis de IgG1 e IgG2a induzidos, com a significativa produção de IFN-γ e os baixos níveis biológicos detectáveis de IL-10. Desta maneira, PSECr-Montanide, foi capaz de gerar uma resposta mista de subclasses de IgG, ou seja, modulada por células Th1 e Th2. Um perfil misto de resposta imune também foi induzido em camundongos imunizados com HSP60r, no entanto, esta vacina de proteína recombinante não foi capaz de proteger os animais após o desafio com *C. pseudotuberculosis* [31].

Em conclusão, nossos resultados indicam que pcDNA*psec*+PSECr e PSECr-Montanide são fortes candidatas a serem aprimoradas e testadas como vacinas contra linfadenite caseosa em ovinos e caprinos, pois foram capazes de induzir resposta imune humoral e celular, protegendo parcialmente os camundongos após desafio com *C. pseudotuberculosis*.

5. Agradecimentos

Aos órgãos financiadores, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária – EMBRAPA.

6. Referências

[1] Araújo CLDA, Dias LM, Veras AAO, Alves JTC, Cavalcante ALQ, Dowson CG, et al. Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* 262 biovar *equi* isolated from cow milk. Genome Announcements 2016; 4(2).

[2] Mira C, Fatima B K, Fadhela S, Kada K, Yacine T. Epidemiological and Histopathological Studies on Caseous Lymphadenitis in Slaughtered Goats in Algeria. Global Veterinaria 2014; 13(6):1065-1068.

[3] Baraúna RA, Ramos RTJ, Veras AAO, De Sá PHCG, Guimarães LC, Das Graças DA et al. Genomic analysis of four strains of Corynebacterium pseudotuberculosis bv. Equi isolated from horses showing distinct signs of infection. Standards in Genomic Sciences 2017; 12:16.

[4] Muge GRS, Veras AAO, de Sá PHCG, Cavalcante ALQ, Alves JTC, Morais E, et al. Genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain PA02 isolated from an ovine host in the Amazon. Genome Announcements 2016; 4(4): e00838-16.

[5] Santana-Jorge KTO, Santos TM, Tartaglia N, Aguiar EL, Souza RFS, Mariutti RB, et al. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. Microbial Cell Factories 2016; 15:83.

[6] Dorela FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. Corynebacterium pseudotuberculosis: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Veterinary Research 2006; 37: 201-218.

[7] Droppa-Almeida D, Vivas WLP, Silva KKO, Rezende AFS, Simionatto S, Meyerd R, et al. Recombinant CP40 from Corynebacterium pseudotuberculosis confersprotection in mice after challenge with a virulent strain. Vaccine 2016; 34:1091-1096.

[8] Jain S, Afley P, Dohre SK, Saxena N, Kumar S. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmidDNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of Brucella abortus inBALB/c mice. Vaccine 2014; 32: 4537-4542.

[9] Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. Advanced Drug Delivery Reviews 2010; 62(1):12-27.

[10] Jayakumar R, Chennazhi KP, Muzzarelli RAA, Tamura H, Nair SV, Selvamurugan N. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy**.** Carbohydrate Polymers 2010; 79(1)1-8.

[11] Ishikawa S, Hara Y, Ohnishi R, Sekiguchi J. Regulation of a new cell wall hydrolase gene, cwlF, which affects cell separation in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 1998; 180:2549-2555.

[12] Anantharaman V, Aravind L. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. Genome Biology 2003; 4(2): Article R11.

[13] Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. Journal of Controlled Release 2001; 70:399-421.

[14] Miles AP, Mcclellan HA, Rausch KM, Zhu D, Whitmore MD, Singh S, et al. Montanide ® ISA 720 vaccines: quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. Vaccine 2005; 23:2530–9.

[15] Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. Journal of Immunological Methods 1998; 221:35-41.

[16] Costa MP, McCulloch JA, Almeida SS, Dorella FA, Fonseca CT, Oliveira DM, et al. 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 2011; 4:243.

[17] Silva JW, Droppa-Almeida D, Borsuk S, Azevedo V, Portela RW, Miyoshi A, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* cp09 mutant and cp40 recombinant protein partially protect mice against caseous lymphadenitis. BMC Veterinary Research 2014; 10:965.

[18] Jesse FF, Sang SL, Saharee A, Shahirudin S. Pathological changes in the organs of mice model inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* organism. Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science 2011; 34:145–9.

[19] Brum AA, Rezende AFS, Brilhante FS, Collares T, Begnine K, Seixas FK. Recombinant esterase from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in DNA and subunit recombinant vaccines partially protects mice against challenge. Journal of Medical Microbiology 2017; 66(5):635-642.

[20] Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. Expert Review Vaccines 2016; 15(3):313-329.

[21] Zhao K, Zhang Y, Zhang X, Shi C, Wang X, Wang X, et al. Chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles as an efficient delivery system for Newcastle disease virus DNA vaccine. International Journal of Nanomedicine 2014; 9:4609-4619.

[22] Gerdts V, Mutwiri G, Richards J, van Drunen Littel-van den Hurk S, Potter AA. Carrier molecules for use in veterinary vaccines. Vaccine 2013; 31(4):596-602.

[23] Mokhtarzadeh A, Alibakhshi A, Yaghoobi H, Hashemi M, Hejazi M, Ramezani M. Recent advances on biocompatible and biodegradable nanoparticles as gene carriers. Expert Opinion on Biological Therapy 2016; 16(6):771-85.

[24] Cordeiro AS, Alonso MJ, De La Fuente M. Nanoengineering of vacines using natural polysaccharides. Biotechnology Advances 2015; 33:1279-1293.

[25] Demento SL, Siefert AL, Bandyopadhyay A, Sharp FA, Fahmy TM. Pathogenassociated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. Trends in Biotechnology 2011; 29(6):294-306.

[26] Gupta J, Pathak M, Misra S, Misra- Bhattacharya S. Immunogenicity and protective efficacy of brugia malayi heavy chain myosin as homologous DNA, protein and heterologous DNA/Protein prime boost vaccine in rodent model. Plos One 2015; 10(11): e0142548.

[27] Golshani M, Rafati S, Siadat SD, Nejati-Moheimani M, Shahcheraqhi F, Arsang A, et al. Improved immunogenicity and protective efficacy of a divalent DNAvaccine encoding Brucella L7/L12-truncated Omp31 fusion protein bya DNA priming and protein boosting regimen. Molecular Immunology 2015; 66:384-391.

[28] Golshani M, Rafati S, Nejati-Moheimani M, Ghasemian M, Bouzari S. Comparison of potential protection conferred by three immunization strategies (protein/protein, DNA/DNA, and DNA/protein) against Brucella infection using Omp2b in BALB/c Mice. Veterinary Microbiology 2016; 197:47-52.

[29] Lan DT, 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. The Journal of Veterinary Medical Science 1999; 61(11):1203-1208.

[30] Shaikh PZ. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. International Journal of Pharmacy and Life Sciences 2011; 2(11):1247-1263.

[31] Pinho MJR, Dorella FA, Coelho K da S, Fonseca CT, Cardoso FC, Meyer R, et al. 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. Open Veterinary Science Journal 2009; 3:22-27.

Figuras e Legendas

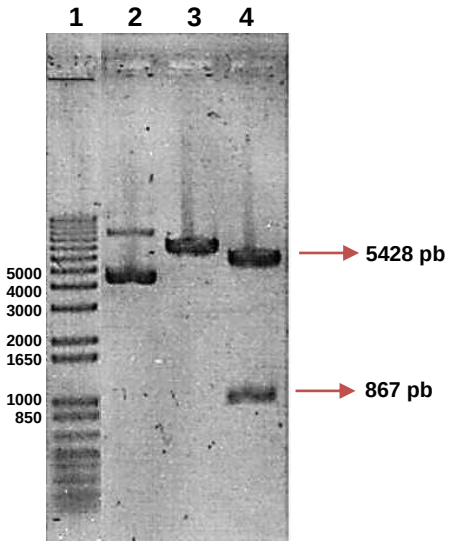

Figura 1: Análise de reação de clivagem do plasmídeo vacinal pcDNA*psec.* Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em *Syber Gold*. Plasmídeo vacinal submetido a reações de clivagem utilizando enzimas de restrição *Bam HI* e *Eco RI*. Canaleta 1 – Marcador Molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2 - Plasmídeo vacinal não clivado. Canaleta 3 - Reação de restrição com o plasmídeo recombinante e enzima *BamHI*, observando-se 8295 pb correspondente ao plasmídeo vacinal pcDNA*psec.* Canaleta 4 - Reação de restrição do plasmídeo vacinal com as enzimas *Bam HI* e *Eco RI*, observando-se uma banda de 5428 pb correspondente ao plasmídeo pcDNA3.1+ e uma banda de 867 pb correspondente ao gene *psec*.

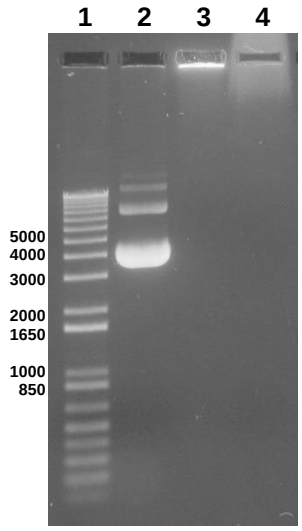

Figura 2: Eficiência de proteção contra DNAse I. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em *Syber Gold.* Canaleta 1- Marcador Molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2- pcDNA*psec* não digerido. Canaleta 3- pcDNA*psec*-Quitosana + DNAse I. Canaleta 4- pcDNA*psec* + DNAse I.

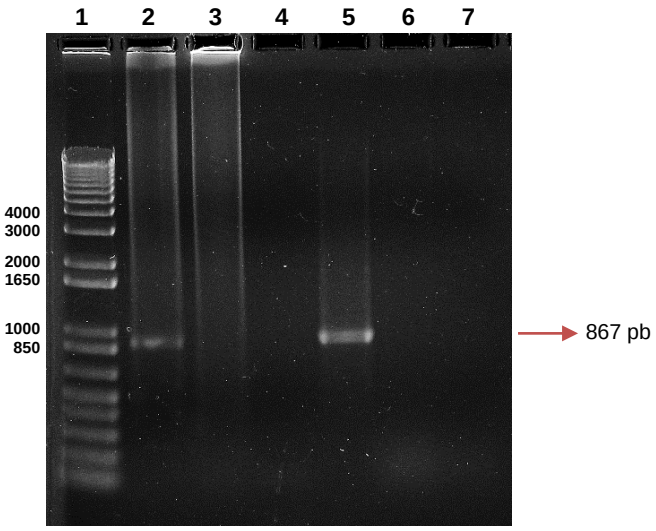

Figura 3: RT-PCR com cDNA obtido a partir do RNA total extraído de músculos de animais injetados com 100 µg de pcDNA*psec*+Quitosana. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado em *Syber Gold*: Canaleta 1 - Marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2 - Animal eutanasiado após 72 h da inoculação. Canaleta 3 - Animal eutanasiado após 144 h da inoculação. Canaleta 4 - Animal eutanasiado após 360 h da inoculação. Canaleta 5 -Controle positivo da PCR. Canaleta 6 - Controle negativo da PCR. Canaleta 7 - Controle negativo da Transcrição Reversa.

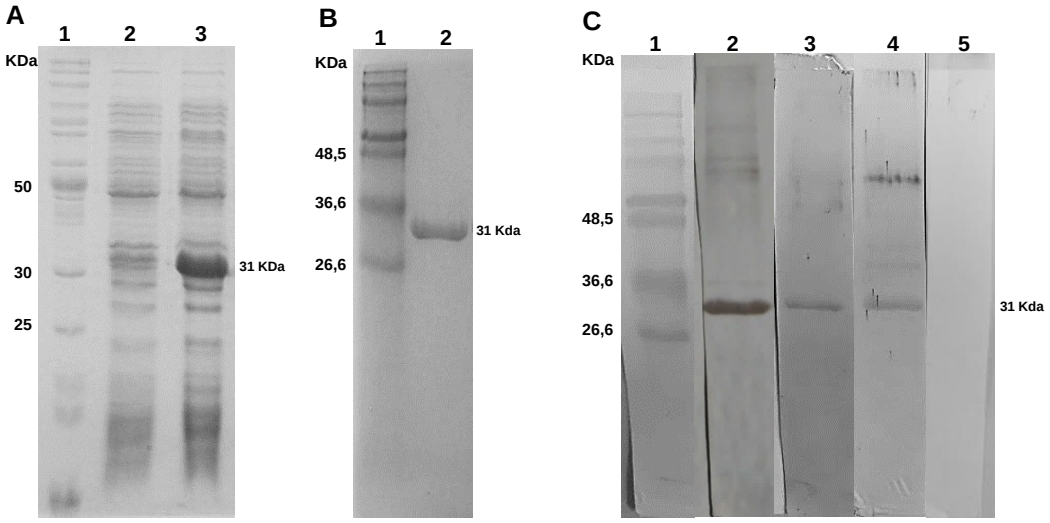

Figura 4: Produção, purificação e avaliação da antigenicidade da PSECr. Eletroforese em gel SDS-PAGE – 12% corado com Coomassie Blue R-250. (A) Indução da expressão gênica de *psec*: Canaleta 1 - Marcador de proteína – BenchMark Protein Ladder (Life Techcnologies). Canaleta 2 - Perfil das proteínas de *Escherichia coli* antes da indução com isopropil-tio-β-galactosídeo (IPTG). Canaleta 3 - Indução de PSECr após 4 h de adição com 1mM de IPTG. (B) Purificação de PSECr por cromatografia de afinidade em resina de níquel (ProBond Purification System, Invitrogen): Canaleta 1- marcador de peso molecular de proteínas - Prestained Molecular Weight Marker (Sigma). Canaleta 2- Banda correspondente a proteína PSECr purificada (31 kDa). (C). Análise por meio de *Western blotting* da proteína PSECr de *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Canaleta 1- marcador de peso molecular de proteínas - Prestained Molecular Weight Marker (Sigma). Canaleta 2 - Soro de camundongo anti histidina. Canaleta 3 – Soro de ovino naturalmente infectado. Canaleta 4 - Soro de caprino naturalmente infectado. Canaleta 5- Soro de caprino livre de patógeno como controle negativo.

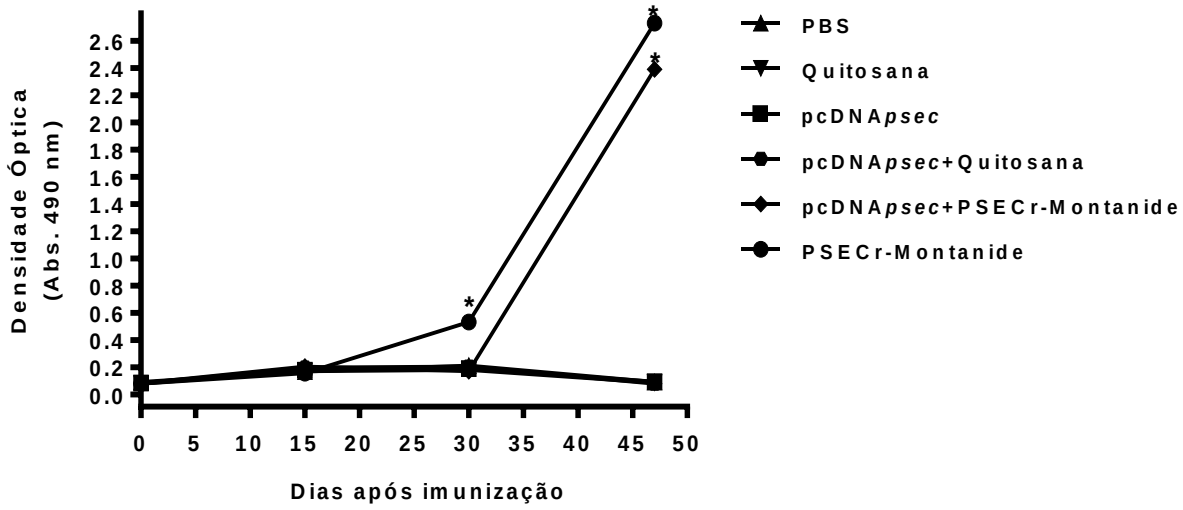

Figura 5: Detecção de IgG específico para o antígeno PSECr. Cinética da indução de IgG representada pela média das densidades ópticas de cada grupo, a cada período após as imunizações. O símbolo * demonstra diferença significativa ($p<0,05$) do grupo pcDNA*psec*+PSECr, no dia 47 e, do grupo PSECr-Montanide, nos dias 30 e 47, quando comparados aos demais grupos.

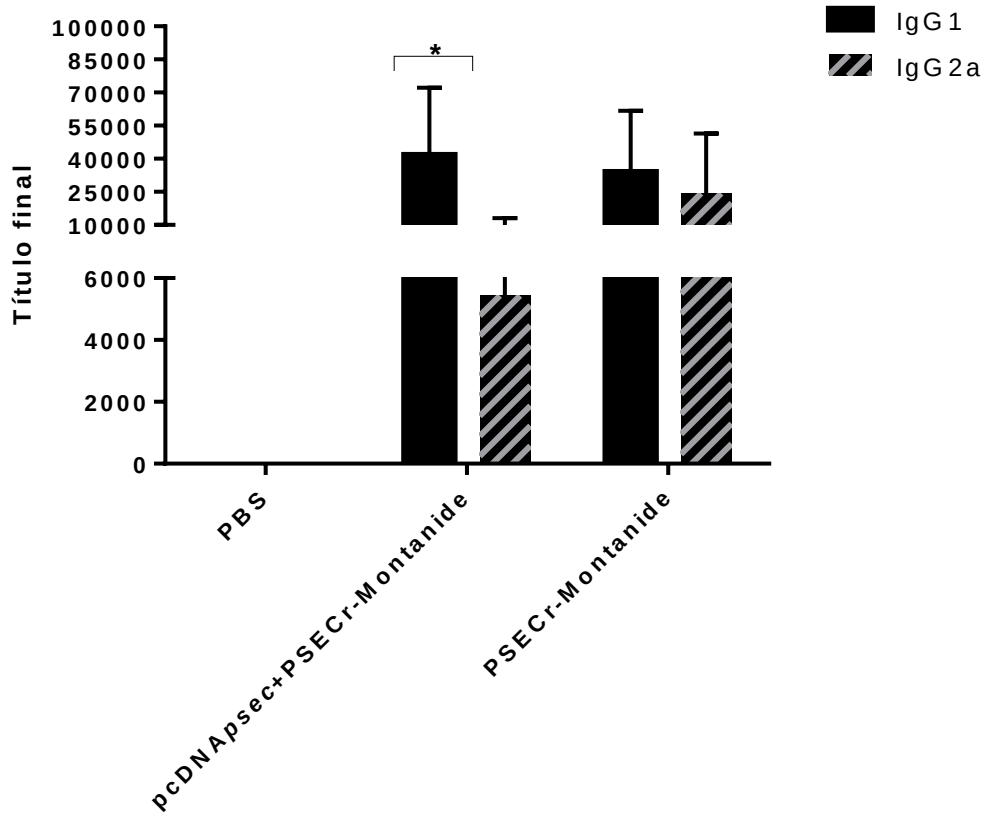

Figura 6: Título final dos isotipos IgG1 e IgG2a nos soros dos camundongos, 47 dias após a primeira imunização. Estão representadas as médias das densidades ópticas de cada grupo com seus respectivos desvios padrões. O símbolo * demonstra diferença significativa ($p<0,05$), quando comparadas as médias entre os títulos de IgG1 e IgG2a.

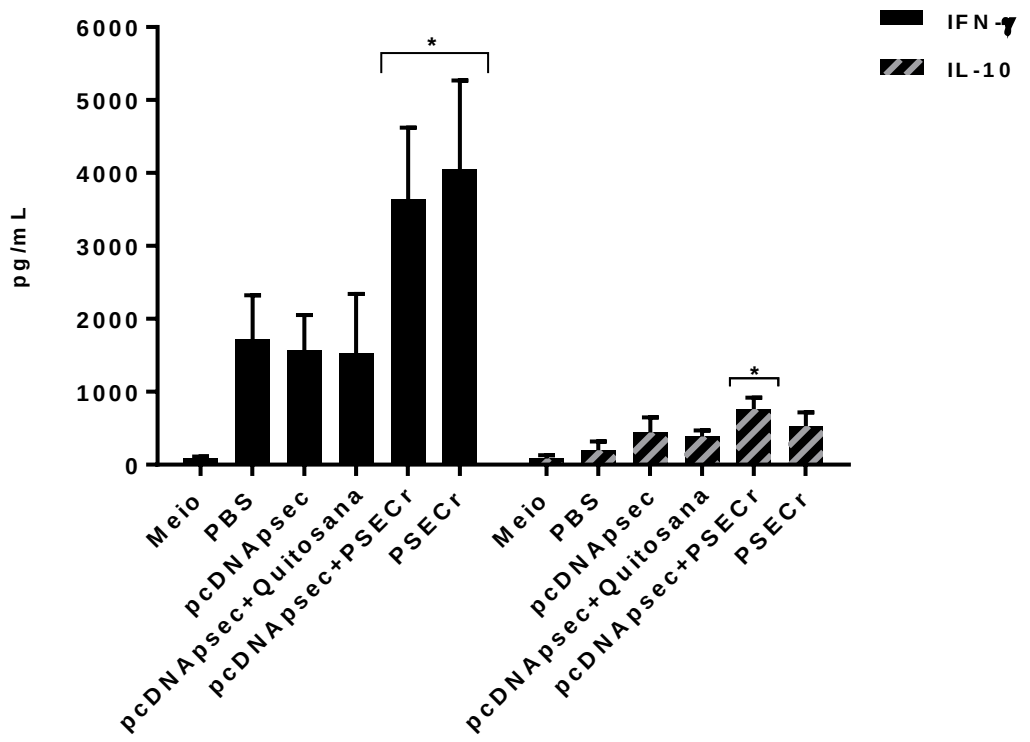

Figura 7: Determinação da concentração das citocinas IFN-γ e IL-10 no sobrenadante do cultivo de esplenócitos, obtidos de camundongos imunizados com as formulações vacinais e controles, por meio de ELISA de captura. Médias dos níveis de produção das citocinas IFN-γ e IL-10. O símbolo * demonstra diferença significativa ($p<0,05$) na produção de IFN-γ e IL-10 em relação às demais vacinas e controles.

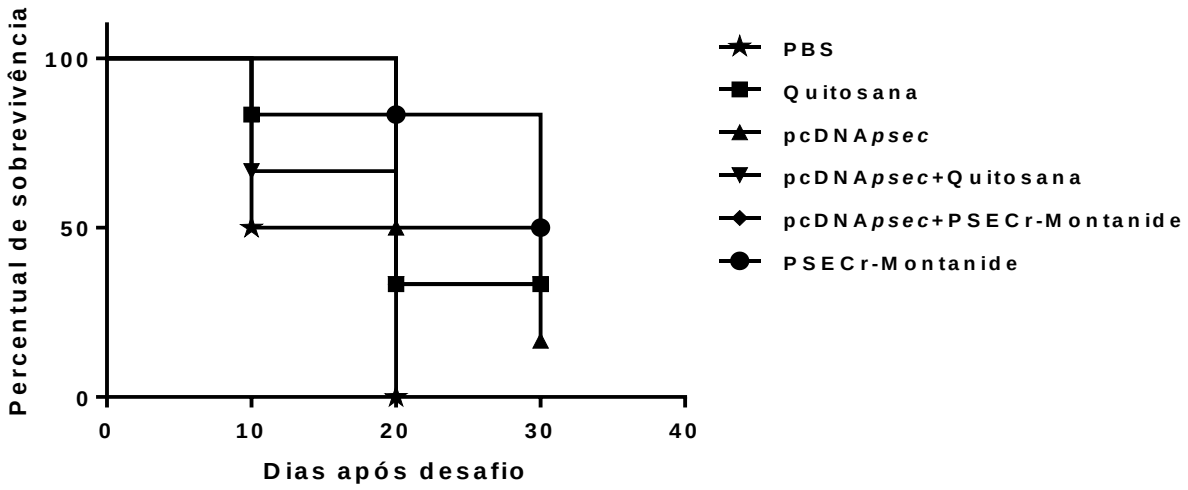

Figura 8: Curva de sobrevivência dos animais dos grupos testes e grupos controles, desafiados com $2x10^6$ da cepa virulenta CP 28033 de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Os animais foram monitorados por 30 dias, para avaliar a presença e gravidade dos sinais clínicos de doença ou mortalidade.

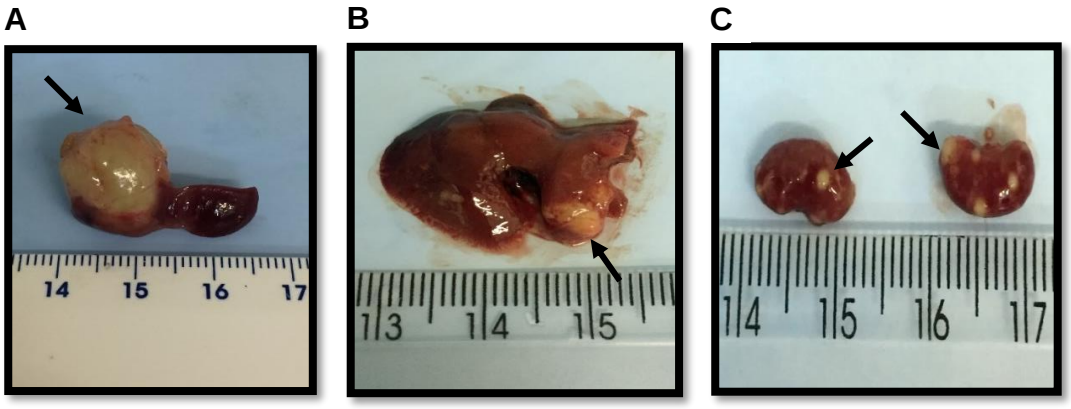

Figura 9: Orgãos de camundongos com alterações anatomopatológicas causadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, após desafio. (A) baço; (B) fígado; (C) rins. As setas pretas indicam os abscessos caseosos.