

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA  
DE DNA CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Simone Camargo Sanches

CAMPO GRANDE, MS  
2013

2013

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA DE DNA  
CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis*  
SANCHES, S. C.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA VACINA DE  
DNA CONTRA *Corynebacterium pseudotuberculosis***  
Development and evaluation of a DNA vaccine against *Corynebacterium  
pseudotuberculosis*

**Simone Camargo Sanches**

**Orientador: Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares**  
**Co-orientadoras: Prof<sup>a</sup> Dra. Grácia Maria Soares Rosinha**  
**Prof<sup>a</sup> Dra. Lenita Ramires dos Santos**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Mato Grosso  
do Sul, como requisito à obtenção do  
título de Mestre em Ciência Animal.  
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS  
2013



---

Certificado de aprovação

**SIMONE CAMARGO SANCHES**

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEÇÃO A RESPOSTA HUMORAL  
DE UMA VACINA DE DNA CONTRA CORYNEBACTERIUM  
PSEUDOTUBERCULOSIS**

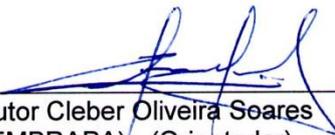
Construction and Evaluation of Protection and Humoral Response of a DNA vaccine against  
*Corynebacterium pseudotuberculosis*

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Mato grosso do Sul, como requisito à  
obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

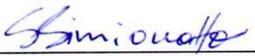
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado (a) em: 30/07/2013

**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
Doutor Cleber Oliveira Soares  
(EMBRAPA) - (Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Doutor Cristiano Marcelo Espínola Carvalho  
UCDB

  
\_\_\_\_\_  
Doutora Simone Simionatto  
UFGD

*À minha maravilhosa família: Meu Pai-Herói João,  
Minha inigualável Mãe Sandra, minhas irmãs-  
cúmplices Cristiane e Mônica “in memorian”, minha  
carinhosa Avó Enermia, ao meu grande amor Renato.  
E especialmente, a cada animal envolvido neste estudo,  
que com suas vidas, contribuíram muito mais que eu  
para a realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Dr. Cleber Oliveira Soares, pela oportunidade.

À minha co-orientadora Dra. Grácia Rosinha, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e convívio.

À Dra Lenita Ramires, co-orientadora por ser um exemplo profissional, pelos ensinamentos, paciência, dedicação e sempre disposição em ajudar e esclarecer dúvidas.

À toda equipe do Laboratório de Engenharia Genética Animal da Embrapa Gado de Corte, principalmente à equipe que trabalha com *C. pseudotuberculosis* (Cleber Galvão, Patrícia Melo, e Juliana Gomes), não somente pela ajuda técnica, mas pelo exemplo de trabalho em equipe, companheirismo, por sempre procurar crescer juntos em prol de um trabalho mais completo e pela amizade, que com certeza será para toda a vida!

Aos amigos (as) pessoais: Dr. Koller, Letícia Carvalho, Ingrid Souza, Letícia Umeda, Cheyenne Santana, Sra. Beatriz e Sra. Catarina pela amizade, parceria, carinho e apoio.

Às minhas irmãs Cristiane e Nádia, pela irmandade, amor e apoio... Sempre!

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo programa de mestrado em Ciência Animal.

Ao CNPq e CAPES, pelas bolsas concedidas.

À Embrapa Gado de Corte pela possibilidade de realização deste trabalho.

**À todos vocês, muito obrigada!**

"É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo o mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser."

*Chico Xavier*

## Resumo

SANCHES, S. C. Desenvolvimento e avaliação de uma Vacina de DNA contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2013. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença zoonótica de ovinos e caprinos causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável por consideráveis perdas econômicas à cadeia da caprinovinocultura. A imunoprofilaxia certificada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é a vacina 1002®, manipulada a partir de uma amostra atenuada de *C. pseudotuberculosis* que é indicada apenas para caprinos. O desenvolvimento de uma vacina de DNA é uma alternativa considerável, pois além de conferir resposta imune humoral e celular é também de baixo custo e fácil manipulação. Assim, o objetivo neste estudo foi desenvolver uma vacina de DNA contra LC, testá-la em camundongos BALB/c, avaliar a produção de anticorpos específicos e níveis de proteção conferida aos animais testados. Para isto, o gene denominado *proteína de superfície de membrana (psm)*, que produz uma proteína potencialmente antigênica, selecionado por técnica de imunovarredura de uma biblioteca de expressão de *C. pseudotuberculosis* foi usado como alvo da construção de uma vacina de DNA. Parte deste gene foi amplificado pela PCR e clonado nos plasmídeos pET28a e pcDNA3.1+ para produção de proteína recombinante *in vitro* e expressão *in vivo*, respectivamente. Grupos de cinco camundongos da linhagem BALB/c receberam quatro doses do candidato a imunógeno e associação (pcDNA<sub>psm</sub>, pcDNA<sub>psm</sub> + pCIIL-12) e doses controle (pcDNA3.1+, pCIIL-12 e PBS). Amostras sanguíneas foram coletadas após 15 dias de cada inoculação para posterior análise humoral. O ELISA indireto revelou que o candidato a imunógeno foi capaz de induzir resposta específica de IgG e subclasse IgG1 e IgG2a e os estudos de proteção mostraram que o candidato a imunógeno pcDNA<sub>psm</sub> evitou a morte de 20% dos animais testados.

Palavras-chave: linfadenite caseosa, vacina de DNA, proteína recombinante, ELISA.

## Abstract

SANCHES, S. C. Development and evaluation of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2013. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

The caseous lymphadenitis (CL) is a zoonotic disease of sheep and goats caused by the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsible for considerable economic losses to the chain caprinovinocultura. The immunoprophylaxis adopted by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply is the vaccine 1002®, manipulated from a sample attenuated *C. pseudotuberculosis* and does not confer immunity sufficient to protect the animals. The development of a DNA vaccine is a considerable alternative because besides conferring humoral and cellular immune response is also low cost and easy handling. The objective of this study was to construct a DNA vaccine against LC, test it in BALB/c and assess levels of specific antibodies in animals. For this, the gene called *Surface Protein Membrane* (psm) which produces a potentially antigenic protein selected by a technique immunoscreening expression library of *C. pseudotuberculosis* was used as a target for construction of a DNA vaccine. Part of this gene was amplified by PCR and cloned into pcDNA3.1+ plasmids pET28a and for the production of recombinant protein expression *in vitro* and *in vivo*, respectively. Groups of five mice of BALB/c were with four doses of vaccine plasmids (pcDNA<sub>psm</sub> and pcDNA<sub>psm</sub> + pCIIL-12) and dose control (pcDNA3.1 +, pCIIL-12 and PBS). Blood samples were collected 15 days after each injection for analysis humoral. The ELISA revealed that the formulation was able to induce specific IgG response and subclasses IgG1 and IgG2a, and studies have shown that protection formulation preventing the death of 20% of the tested animals.

Keywords: caseous lymphadenitis, DNA vaccine, recombinant protein, ELISA

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Agente Etiológico .....	2
2.1.1 Histórico.....	2
2.1.2 Características do microorganismo e cultivo .....	3
2.1.3 Antígenos imunodominantes e protetores.....	4
2.1.4 Fatores de virulência.....	5
2.2 Epidemiologia.....	6
2.2.1 Distribuição geográfica e prevalência .....	6
2.2.2 Hospedeiros, fonte de infecção e transmissão.....	7
2.2.3 Potencial zoonótico e Implicações em saúde pública .....	8
2.3 Patogenia e manifestações clínicas .....	9
2.4 Resposta Imune.....	11
2.5 Diagnóstico, tratamento e profilaxia.....	13
2.6 Vacinas de DNA .....	14
2.7 Vacina de DNA contra <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	16
2.8 Biblioteca genômica e imunovarredura.....	16
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	17
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	30
RESUMO .....	30
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
Amplificação por PCR, clonagem do gene no vetor de expressão em procariotos e produção da proteína recombinante PSMr .....	32
Construção da vacina de DNA no vetor pCDNA3.1+ .....	33
Isolamento de RNA e detecção de mRNA de <i>psm</i> por RT-PCR.....	33
Imunização e desafio .....	34
Ensaio de anticorpos antígeno-específicos IgG utilizando ELISA .....	34
Ensaio de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a utilizando ELISA .....	35
Análise estatística.....	36
RESULTADOS .....	36

Produção de proteína recombinante PSMr .....	36
Construção Vacinal .....	38
Mensagem Vacinal .....	38
Resposta de anticorpos anti-PSMr .....	39
Estudos de Proteção .....	40
DISCUSSÃO .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## INTRODUÇÃO

A criação de ovinos e caprinos vem ganhando espaço no agronegócio brasileiro, e assim criando novas oportunidades no mercado nacional de produtos de origem animal. No ano de 2011 o Estado de Mato Grosso do Sul possuía um rebanho ovino de 497.631 cabeças e caprino de 39.556 cabeças, o que corresponde a 2,82% e 0,42% do rebanho nacional, respectivamente. A evolução na demanda de produtos de origem ovina e caprina despertou a necessidade do uso de tecnologias na produção destes animais visando o aumento na produção, bem-estar, saúde animal e alimentos saudáveis e seguros.

Uma das principais causas de prejuízos na criação de ovinos e caprinos é o acometimento do rebanho por enfermidades contagiosas que são disseminadas principalmente por manejo inadequado e falta de orientação adequada aos criadores, quanto à sanidade de seu rebanho.

A linfadenite caseosa (LC), também conhecida como mal do caroço, é uma das principais doenças infectocontagiosas que acometem ovinos e caprinos. O agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BENHAM et al., 1962; CAMERON & MINNAR, 1969; BATEY, 1986b). Esta enfermidade é caracterizada por causar abscessos que possuem material purulento de cor amarelo-esverdeada e consistência firme. A forma clínica apresenta abscessos em linfonodos superficiais e/ou pele. Já a forma subclínica é acompanhada por abscessos em linfonodos internos e órgãos como os pulmões e fígado (KIMBERLING, 1988; SMITH & SHERMAN, 1994; PEKELDER, 2000; SOBRINHO, 2001).

Além de ser uma zoonose, essa enfermidade possui caráter crônico e é responsável por grandes perdas econômicas por causar diminuição na produção de carne, leite e lã (quando os linfonodos superficiais são acometidos) e ainda desvalorização da pele devido a cicatrizes advindas dos abscessos. Na forma visceral, a doença atinge órgãos o que resulta no emagrecimento, na condenação de carcaças e na morte do animal. (KIMBERLING, 1988; WILLIAMSON, 2001; MEYER et al., 2002).

O uso de antibióticos não é recomendável, devido à impossibilidade de penetração pela espessa cápsula dos abscessos e pela capacidade de deixar resíduos na carne e leite, portanto faz-se necessário o uso de medidas profiláticas. No Brasil o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) certificou a Vacina 1002®, obtida a partir de uma cepa de *C. pseudotuberculosis* naturalmente atenuada, mas que é indicada para o uso apenas em caprinos.

A LC é endêmica no Brasil, e possui uma prevalência clínica média de aproximadamente 30% dos animais (SOBRINHO, 2001). A prevalência desta doença em pequenos ruminantes é geralmente subestimada, uma vez que sua notificação não é obrigatória no Brasil e em vários países, e muitos criadores não têm a consciência do seu impacto econômico e não indentificam animais com sintomas subclínicos dificultando assim seu controle (BAIRD & FONTAINE, 2007).

Considerando a relevante importância da LC na cadeia da caprinovinocultura se faz necessária a produção de novas vacinas que confirmem maior proteção a caprinos e ovinos e sejam facilmente manipuladas. Assim, propõe-se neste estudo construir uma vacina de DNA contra LC, testá-la em camundongos BALB/c e avaliar a produção de anticorpos específicos e níveis de proteção conferida nos animais testados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Agente Etiológico

#### 2.1.1 Histórico

O agente etiológico da Linfadenite Caseosa é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BENHAM et al., 1962; CAMERON & MINNAR, 1969; BATEY, 1986b). *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi descrita primeiramente por Edmond Nocard em 1888, após ter sido isolada de uma lesão oriunda de uma linfangite bovina (NOCARD, 1896, revisto em ALVES et al., 2007). Em 1891, Hugo Von Preisz cultivou bactérias provenientes de uma lesão renal de ovelha e constatou semelhanças entre estas e a bactéria isolada por Nocard. Daí então esta bactéria passou a ser chamada de Bacilo de Preisz-Nocard (SMITH, 2003). Em 1896, Lehmann e Neumann passaram a chamar a bactéria por “*Pseudes tuberculosis*” (do grego, falsos tubérculos), devido à suposta similaridade clínica entre lesões causadas por esta bactéria e lesões desenvolvidas por bactérias causadoras da tuberculose, a *Mycobacterium tuberculosis* (BAIRD & FONTAINE, 2007). Em 1948 durante a 6ª edição do Bergey’s Manual a nomenclatura passou a ser designada oficialmente por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (COSTA, 2002; ALVES, 2007; BAIRD & FONTAINE, 2007).

### 2.1.2 Características do microorganismo e cultivo

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa, difteróide típico que se caracteriza como um bacilo Gram-positivo curto e irregular (0,5 a 0,6 µm por 1 a 3 µm), pode se apresentar com aspecto cocóide, se mostrar isolado, formando grupamentos irregulares ou em paliçada, são imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e não formam esporos (BENHAM et al., 1962; MERCHANT & PACKER, 1975; BATEY, 1986b; QUINN et al., 1994; BAIRD & FONTAINE, 2007). Esta bactéria é catalase positiva, geralmente reduz nitrato e telurito, raramente acidifica lactose, rafinose ou liquefaz gelatina (ABREU et al., 2008).

Este microorganismo faz parte do grupo de bactérias do gênero *Corynebacterium* que juntamente com bactérias que fazem parte dos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* compõem o complexo “CMNR” (BARKSDALE et al., 1891). Bactérias representantes desse grupo são caracterizadas por possuírem parede celular lipídica densa (JOLLY, 1966), que a torna hidrofóbica e pode contribuir para a leucotoxicidade e sua sobrevivência dentro dos fagócitos (BIBERSTEIN & HIRSH, 2003). A fração lipídica da parede interfere no processo de fagocitose, pois impede a hidrólise enzimática dos lisossomos e potencializa os efeitos citotóxicos no hospedeiro e está diretamente relacionada à característica piogênica da afecção, reconhecida como fator determinante na virulência do microorganismo (SMITH et al., 1997; WILLIAMSON, 2001; MEYER et al., 2005).

A presença destes lipídios é ainda, atribuído ao crescimento padrão em meio líquido, formando flocos característicos (e a formação de uma película mais densa confere uma maior virulência) (JOLLY, 1966). A formação de flocos ainda dificulta a padronização de inóculos, pois a quantidade de colônias viáveis é consideravelmente diminuída. O rendimento da cultura pode ser aumentado com adição de mono-oleato de sorbitan, Tween 80, além de aumentar a atividade hemolítica desses microorganismos (JOLLY, 1966; BATEY, 1986a SUTHERLAND et al., 1989).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é um microorganismo exigente nutricionalmente, já que o seu crescimento ótimo ocorre, principalmente, em meios BHI (infusão de coração e cérebro) enriquecidos com soro ou sangue animal (COSTA, 2002). Em experimento de curva de crescimento bacteriano realizado por Carvalho e colaboradores em 2013, indica que *C. pseudotuberculosis* tem melhor crescimento em soro fetal bovino (SFB). Essa taxa aumentada está relacionada diretamente com a mudança da fisiologia da bactéria perante o contato com fatores fisiológicos de um hospedeiro, já que o SFB tem uma gama de

componentes fisiológicos como proteínas séricas, hormônios, lipídeos e vitaminas. O crescimento pode ser melhorado ainda, quando é adicionado extrato de levedura, triptona ou lactoalbumina (CAMERON & SWART, 1965). O meio sólido ideal para o crescimento dessas bactérias é o ágar BHI enriquecido com sangue, onde se formam colônias pequenas, de coloração branco-acinzentada, opacas e friáveis após um período de 24 à 48 horas (BROWN, 1986). Após 72 horas de incubação, as colônias podem atingir de 2 à 3 mm de diâmetro, assumem coloração creme-amarelada e podem ser deslocadas na superfície do meio pela grande quantidade de lipídio da parede celular (QUINN et al., 1994).

O crescimento é anaeróbio facultativo, mas pode ser melhorado quando é cultivado em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (BENHAM et al., 1962; MUCKLE & GYLES, 1983). A faixa de temperatura de crescimento de *C. pseudotuberculosis* está entre 14 e 40°C, porém seu crescimento ótimo ocorre em temperatura de 37°C e em pH de 7,0 a 7,8 (MUCKLE & GYLES, 1983; QUINN, 1994; COSTA, 2002).

### 2.1.3 Antígenos candidatos vacinais

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de identificarem e caracterizarem antígenos que possam estar relacionados à *C. pseudotuberculosis*, seja na célula bacteriana (antígenos somáticos) ou estarem no sobrenadante de cultura bacteriana (antígenos secretados) (ALVES et al., 2007). Além da fosfolipase D (antígeno somático) várias proteínas foram identificadas como potenciais antígenos de *C. pseudotuberculosis*.

Em 1991, Ellis identificou, por meio da técnica de *Western Blotting*, 22 proteínas com pesos moleculares entre 12 e 120 kDa, reagentes a soro de animais infectados quando estudava resposta de anticorpos em animais infectados. Muckle e colaboradores em 1992 identificaram em sobrenadante de extrato bacteriano, também por *Western Blotting* sete antígenos reagentes ao soro de 40 animais acometidos pela LC (estudo de resposta humoral). Nenhum dos sete antígenos foi detectado pelos soros de 160 ovinos sem a doença. Ainda em 1992, Ter Laak e colaboradores identificaram seis proteínas com peso molecular entre 29 e 68 kDa que reagiram com soro de ovinos e caprinos infectados naturalmente e experimentalmente.

Braitwaite e colaboradores em 1993 utilizou o método dodecil sulfato de sódio gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e pôde observar mais de 20 bandas proteicas que compõem as células bacterianas em um estudo de classificação de proteínas provenientes de amostras de *C. pseudotuberculosis*.

Em 1994 Walker e colaboradores identificaram por meio da técnica de *Western Blotting* um antígeno de 40 kDa e o nomearam de CP-40. O antígeno CP-40 foi então associado ao hidróxido de alumínio e utilizado como imunógeno em ovinos e estimulou uma resposta protetora de 82% nos animais imunizados. No ano seguinte o gene correspondente a proteína CP-40 foi clonado e sequenciado, e verificaram que esta proteína é diferente daquelas que já tinham sido sequenciadas até então. A análise bioquímica da proteína revelou propriedade proteolítica, provavelmente pertencente ao grupo das serino-proteases e similaridade com a toxina PLD, ambas são hidrofóbicas. A CP-40 foi sugerida como possível fator de virulência (BAIRD & FONTAINE, 2007).

Paule e colaboradores em 2004 utilizaram SDS-PAGE e *imunoblotting* para buscar possíveis antígenos secretados e/ou somáticos. A fração secretada foi obtida a partir do sobrenadante de culturas celulares em meio BHI, por tratamento com NaCl 1M, já a fração somática foi obtida por métodos ultrassônicos e detergentes, e assim puderam identificar proteínas de alto peso molecular não descritas até então.

#### **2.1.4 Fatores de virulência**

*Corynebacterium pseudotuberculosis* produz vários fatores de virulências, sendo que dois antígenos se destacam: uma potente exotoxina hemolítica PLD - fosfolipase D (o fator virulento mais importante de *C. pseudotuberculosis*) e um lipídeo de superfície, o ácido micólico, que constitui 6,52% da parede celular deste microorganismo (HODGSON et al., 1990; HODGSON et al., 1999; EUZÉBY & GUÉRIN-FAUBLÉE, 2000; ALEMAN & SPIER, 2001). A fosfolipase D está relacionada com a disseminação de *C. pseudotuberculosis* no organismo hospedeiro e o ácido micólico é um importante fator piogênico. Tais antígenos contribuem para a inflamação, edema e disseminação do microorganismo durante a formação dos abscessos (SONGER et al., 1997).

A exotoxina PLD foi identificada em *C. pseudotuberculosis* primeiramente por Carne em 1940 e sua produção foi encontrada por Songer e colaboradores em todas as cepas estudadas. Esta exotoxina possui 31 kDa e é responsável pela disseminação da bactéria dentro do hospedeiro, mediante o aumento da permeabilidade vascular local, através da destruição da esfingomiéline na parede celular vascular (BROWN & OLANDER, 1987).

A permeabilidade vascular tem sido o fator de maior importância quando se trata de pesquisa da exotoxina PLD. Em outros microorganismos patogênicos a PLD é um importante fator de virulência (BAIRD & FONTAINE, 2007), a similaridade entre a exotoxina de *C.*

*pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* (causadora da difteria em humanos) é de 97% (MC NAMARA et al., 1995).

A fosfolipase D é responsável por causar supuração, dermonecrose e morte em diversas espécies de animais de laboratório e de animais domésticos (CARNE, 1940; JOLLY, 1966; LOVELL & ZAKI, 1966).

Já o lipídio tóxico é responsável por uma proteção mecânica e uma possível proteção bioquímica da ação das enzimas hidrolíticas dentro dos lisossomos, permitindo assim a resistência à digestão enzimática celular, bem como sobreviver como um patógeno intracelular facultativo em macrófagos. A atenuação gerada por repiques sucessivos está relacionada a um estreitamento desta camada lipídica (HARD, 1975), porém Cameron & Minnar (1969) comprovaram que a extração por solventes deste componente lipídico não afetava a imunogenicidade da parede celular e Zaki em 1976 complementa mostrando que bactérias que são submetidas a agentes químicos ou físicos perdem a capacidade de matar camundongos, mas mantêm a propriedade de causar lesões piogênicas estéreis.

Há ainda pouco conhecimento sobre os mecanismos moleculares de virulência e controle da expressão gênica da bactéria *C. pseudotuberculosis* (RUIZ et al., 2011).

Portanto, devidos aos poucos dados reportados na literatura sobre a virulência de *C. pseudotuberculosis* observa-se preeminente a identificação de genes responsáveis pelos diferentes mecanismos de virulência e patogenicidade utilizados por este microorganismo, sendo fundamental para o entendimento de como este patógeno causa a doença.

## **2.2 Epidemiologia**

### **2.2.1 Distribuição geográfica e prevalência**

A linfadenite Caseosa é uma importante doença infectocontagiosa muito difundida mundialmente, porém pouco relatada e sua prevalência é subestimada, já que não é de notificação obrigatória em muitos países (BAIRD & FONTAINE, 2007). A linfadenite caseosa pode ainda se apresentar muitas vezes na forma subclínica e assim ser negligenciada por produtores que desconhecem a importância econômica de tal doença.

A prevalência e a incidência da linfadenite caseosa em rebanhos caprinos e ovinos estão relacionadas às condições inadequadas do ambiente, por diminuição das defesas orgânicas dos animais, e pela falta de um programa sanitário integrado de prevenção e controle (BLOOD & HENDERSON, 1999).

A linfadenite caseosa já foi relatada em países que possuem grandes rebanhos ovinos como Canadá, Austrália, França, Nova Zelândia, Estados Unidos, Brasil, Suíça, Uruguai, Venezuela, Turquia, Cuba entre outros, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, tratando-se, portanto de um microorganismo cosmopolita. (RUIZ et al., 1995; LITERAK et al., 1999; PEKELDER, 2000; WILLIAMSON, 2001; ARSENAULT et al., 2003; CABRERA et al., 2003; CHIRINO-ZARRAGA et al., 2005; IVANOVIĆ et al., 2009).

A linfadenite caseosa é endêmica no Brasil, com uma prevalência clínica média de aproximadamente 30% dos animais. (SOBRINHO, 2001). Vários relatos têm sido feitos a respeito da incidência desta doença em diferentes Estados brasileiros. No Estado da Bahia um estudo sorológico, demonstrou a presença de anticorpos séricos contra a *C. pseudotuberculosis* em 46,6% dos caprinos analisados (MEYER, 2004). Já no Estado do Rio de Janeiro, Langenegger e colaboradores (1991), observaram que a incidência média de animais que apresentam a doença é de 29,4 %, com uma variação de 3,6 % a 100 % nos três rebanhos estudados. Em 2009 o rebanho caprino mineiro estava acometido em 78,9% naquele ano, quando os produtores revelaram que apenas 17,5% de seus animais tinham sinais clínicos da LC (SEYFFERT et al., 2010). Na região sul do país foi descrita a ocorrência de 8,09% de LC em ovinos (BELCHIOR et al., 2006).

### **2.2.2 Hospedeiros, fonte de infecção e transmissão**

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é patogênica para uma grande variedade de mamíferos (BAIRD & FONTAINE, 2007). Esta bactéria foi isolada em várias espécies, incluindo cavalos, gado, camelos, suínos, búfalos, e em seres humanos (DORELLA et al., 2006), mas é em ovinos e caprinos que assume importante papel sanitário e econômico.

A linfadenite caseosa, em ovinos e caprinos, ocorre em todas as raças, sexos, e estações do ano. Os animais adultos são os mais comumente acometidos (KIMBERLING, 1988; MEYER et al., 2002; RADOSTITS et al., 2002), sendo mais comum em rebanhos deslanados (VESCHI, 2005). A prevalência aumenta com a idade (IVANOVIĆ et al., 2009).

A principal fonte de propagação da linfadenite caseosa é introdução de animais infectados e troca de equipamentos contaminados entre propriedades. A fonte de infecção mais importante é o conteúdo dos abscessos que supuram e contaminam o meio ambiente. O fator decisivo para a manutenção da fonte de infecção é a habilidade de sobrevivência de *C. pseudotuberculosis* por longos períodos no solo e em materiais diversos (MEYER et al.,

2005). A fistulação de abscessos pode ainda contaminar água, alimentos, utensílios (como tosquiadeiras, pinças de casco e cordas) e materiais cirúrgicos (bisturis, tesouras, pinças) (NOZAKI, 2000; BELCHIOR et al., 2006; RADOSTITS, 2002). A transmissão é facilitada nos sistemas de criação onde há alta densidade populacional (PUGH, 2002) e os reservatórios são os animais infectados (PIONTKOWSKI & SHIVVERS, 1998).

Animais com lesões pulmonares podem representar uma importante fonte de infecção para animais sadios. A descarga de aerossóis de animais acometidos juntamente com ambientes excessivamente contaminados é sugerida como possível via de transmissão nas corinebacterioses (PÉPIN et al., 1994; CHIRINO-ZARRAGA, 2005). Segundo Paton e colaboradores (1995), a fonte de microrganismos, em rebanhos ovinos, poderiam ser lesões pulmonares clinicamente não diagnosticadas.

A porta de entrada de *C. pseudotuberculosis* difere entre ovinos e caprinos devido a diferenças de comportamento entre essas espécies. Alguns autores sugerem que essa variação de portas de entradas resulta da diferença de distribuição de abscessos no corpo das duas espécies, pela diferença anatômica dos linfonodos (COSTA, 2002; CETINKAYA et al., 2002). Nos ovinos, a contaminação da pele após as tosquias e banhos de imersão parece representar os principais fatores de risco na transmissão do patógeno, resultando em abscessos de pele em várias regiões do corpo e enfartamento de linfonodos regionais (COSTA, 2002). Nos caprinos, a alimentação com forragens grosseiras e as abrasões em animais alimentados em canzís, determinariam o predomínio da linfadenomegalia nas regiões da cabeça e pescoço (CETINKAYA et al., 2002).

A doença apresenta um período de incubação longo, o que é um grande problema para criadores já que dificulta a separação entre animais infectados e animais não infectados, dificultando assim o diagnóstico da doença e perpetuando a linfadenite caseosa no rebanho (BATEY, 1986a).

### **2.2.3 Potencial zoonótico e implicações em saúde pública**

O número de notificações da ocorrência de linfadenite caseosa em humanos tem crescido significativamente na última década, normalmente em indivíduos imunossuprimidos (HOUSE et al., 1986; BELCHIOR et al., 2006), porém é uma doença de ocorrência esporádica.

A linfadenite caseosa é caracterizada como uma doença ocupacional, já que acomete médicos veterinários, trabalhadores de frigoríficos e outros profissionais que mantêm contato

com os animais de produção, particularmente pequenos ruminantes e equinos (PEEL et al., 1997; ALVES et al., 2007).

A transmissão do agente para o homem pode ocorrer pelo contato com material purulento procedente de lesões de pele e/ou abscessos de linfonodos (JOIN-LAMBERT et al., 2006). Peel e colaboradores relataram em 1997 um caso de LC humana decorrente de ingestão de carne caprina crua e leite de vaca contaminados com a bactéria *C. pseudotuberculosis*.

A maioria dos casos é descrito em países como Austrália, Nova Zelândia, EUA, França e Espanha, onde se concentram grandes rebanhos ovinos e caprinos (BELCHIOR et al., 2006).

O primeiro caso relatado de LC humana foi feito por Lopez e colaboradores em 1966. O diagnóstico foi realizado por meio de identificação microbiológica do material aspirado do linfonodo acometido e exame anátomo-patológico. O quadro clínico foi caracterizado pela presença de fadiga, dor muscular, fígado aumentado e macio e linfadenopatia localizada. O quadro clínico em humanos é semelhante ao encontrado em ovinos e caprinos (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997). São aproximadamente 33 casos de LC em humanos relatados na literatura segundo Bastos e colaboradores (2012).

A maioria dos casos de LC em humanos foi solucionada com a extirpação cirúrgica do linfonodo abscedado e aplicação de antibióticoterapia (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997; LIU et al., 2005).

Não há dados relatados de casos letais em humanos (BAIRD & FONTAINE, 2007).

### **2.3 Patogenia e manifestações clínicas**

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é considerado um importante patógeno devido aos seus fatores de virulência, principalmente, a fosfolipase D e os ácidos micólicos de sua parede celular. Estes fatores de virulência são responsáveis pela disseminação do patógeno no hospedeiro e pelo poder piogênico de *C. pseudotuberculosis*, sendo então os principais responsáveis no desenvolvimento da patogenia da LC (ALEMAN & SPIER, 2001).

A partir da porta de entrada a bactéria, *C. pseudotuberculosis*, é fagocitada por macrófagos e neutrófilos, e no interior destas células mantém-se ativo (devido à capacidade da densa camada lipídica impedir a ação das enzimas lisossomais) e é então sequestrado para os linfonodos regionais. Como as principais portas de entrada do microorganismo no hospedeiro são via oral, respiratória e feridas lesionadas, os principais linfonodos receptores de células portadoras da bactéria são: pré-crurais, pré-escapulares ou sub-mandibulares.

Estando nos linfonodos as bactérias se multiplicam intracelularmente causando morte celular, desintegração e conseqüentemente formação de múltiplos piogranulomas que evoluem para abscessos. Esse processo é cíclico e recorrente, causando as lesões crônicas típicas da LC em ovinos (PATON et al., 2003; PUGH, 2004; SMITH, 2003; ALVES et al., 2007). O tamanho da lesão parece ser determinado pelo número de microorganismos e pela presença de uma maior quantidade de lipídio citotóxico nessas bactérias (NAIRN & ROBERTSON, 1974; COSTA, 2002).

Por meio da via linfática, ocorre o acometimento do pulmão, fígado, rins e encéfalo, determinando a forma visceral grave da doença (BATEY, 1986b; ALVES et al., 1997; MCKEAN et al., 2007). Em um estudo experimental em modelo murino, desenvolvido por Batey e colaboradores em 1986, há a sugestão de que a disseminação de *C. pseudotuberculosis* ocorra rapidamente do ponto de inoculação (seja livre ou dentro dos fagócitos) para órgãos alvo. As lesões nos órgãos alvo acontecem ao mesmo tempo em que ocorrem nos linfonodos regionais (NAIRN & ROBERTSON, 1974). A disseminação da bactéria no organismo hospedeiro depende, principalmente, da exotoxina liberada com propriedade hemolítica e vasodilatadora (BENHAM et al., 1962; JOLLY, 1966; BURREL, 1981) com atividade fosfolipásica (BATEY, 1986b; SONGER, 1997). Já para Belchior e colaboradores (2006) a disseminação do microorganismo do linfonodo regional para outros órgãos e tecidos depende da virulência da linhagem, da carga bacteriana infectante e higidez do animal. Burrel e colaboradores, em 1981, comprovaram que realmente a fosfolipase D tem papel decisivo na disseminação da bactéria no hospedeiro, quando por meio de um estudo, revela que o uso de antitoxina diminui a permeabilidade vascular e reduz a transferência da bactéria para os linfonodos regionais, protegendo-o do desenvolvimento da lesão.

Em um estudo experimental Batey e colaboradores relatam que camundongos infectados com *C. pseudotuberculosis* ou eliminam a bactéria em um período de 14 dias ou a doença se torna crônica. O que corresponde ao estudo de Jolly em 1966, onde ele diz que a predominância de macrófagos, quando havia, era o suficiente para cessar a disseminação, e quando predominavam células polimorfonucleares, as lesões cronificavam. Em outro estudo, conduzido por McNamara e colaboradores (1994), linhagens mutantes que tinham o gene da PLD deletado, foram utilizadas. Estes mutantes não foram capazes de estabelecer uma infecção primária ou formar granulomas nos linfonodos regionais, confirmando que a exotoxina está envolvida na persistência e disseminação da bactéria no organismo do hospedeiro. Isto demonstra que a resposta do hospedeiro é mais importante que a virulência do

patógeno. A lesão é uma forma de impedir que haja disseminação da bactéria no organismo hospedeiro (COSTA, 2002).

O tempo de incubação da bactéria é longo e a LC pode se manifestar clinicamente dentro de um período de duas a seis semanas após o contato com *C. pseudotuberculosis*. A doença é caracterizada por desenvolver sinais clínicos relacionados com os abscessos produzidos pela infecção. Os linfonodos externos afetados apresentam-se aumentados de volume, firmes e sensíveis à palpação e conseqüentemente o animal apresenta febre e inapetência. Nos casos de abscessos internos, foi constatado perda de peso crônica, subfertilidade, redução na produção de leite, menor número de crias, baixo peso dos cordeiros à desmama e baixa produção de lã. A presença de abscessos nos pulmões determina sinais de dispnéia crônica. As formas internas podem estar associadas com formas externas da doença. (BOGDAN et al., 1997; WILLIAMSON, 2001; PAULE et al., 2003; SMITH, 2003; BELCHIOR, 2006; BAIRD & FONTAINE, 2007).

## 2.4 Resposta imune

A resposta imune do hospedeiro estimulada por *C. pseudotuberculosis* envolve resposta humoral e celular (ELLIS, 1991). *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ao contrário de *Mycobacterium tuberculosis* e de *Brucella abortus*, não impede a fusão entre o fagossomo e o lisossomo dos macrófagos. Assim, esta bactéria intracelular facultativa deve ser capaz de resistir ao ambiente extremamente hostil do fagolisossomo, que é caracterizado pela presença de baixo pH, alta atividade proteolítica e grande potencial oxidativo (TASHJIAN & CAMPBELL, 1983; MCKEAN et al., 2007; ROHDE et al., 2007).

A resposta imune inata é de grande importância no combate à *C. pseudotuberculosis*. Lan e colaboradores em 1998 mostraram em um estudo experimental que camundongos que recebiam anticorpo anti-CR3 (receptor de complemento tipo 3) tinham a proliferação das bactérias desenfreada e estes animais morreram em três dias após a infecção. A resposta inflamatória foi inibida e o estudo histológico mostrou que os fagócitos mononucleares não migraram para o sítio de infecção.

A resposta humoral de animais infectados por *C. pseudotuberculosis* normalmente é intensa e sua importância se deve principalmente por impedir a disseminação do local de infecção para outros órgãos (MEYER, et al., 2005). Além dos linfócitos B, produtores de anticorpos, existe ainda um subgrupo de suma importância no controle da infecção em sua fase inicial que são os linfócitos B-1. Esse subgrupo apresenta em suas superfícies,

marcadores de linhagem mielóide (MAC-1) e linfóide que secretam altos níveis de IgM e baixos níveis de IgD. Estas células têm origem, quando feto, no fígado ou na medula e, são ausentes no sangue e podem ser encontradas em grande quantidade no peritônio. A principal característica dos linfócitos B-1 é seu poder de autorrenovação e secreção espontânea de IgM principalmente contra antígenos bacterianos (CHEVALLIER et al., 1998).

A importância da resposta imune humoral foi evidenciada quando Cameron & Engelbrecht (1978) comprovaram proteção contra a LC como consequência da atuação de anticorpos anti-fosfolipase D por imunização passiva de camundongos. O mesmo anticorpo induziu também a inibição da disseminação de *C. pseudotuberculosis* para linfonodos, produzindo assim efeito protetor (YOZWIAK & SONGER, 1993). Porém, a resposta imune humoral não é suficiente para combater a invasão do microorganismo, que por ser intracelular facultativo, exige também uma forte resposta imune celular (VALE et al., 2003).

Lan e colaboradores (1998) demonstraram que quando camundongos receberam doses de anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8, a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$  foi reduzida (o que inibiu a ativação de macrófagos e consequentemente a produção de substâncias microbicida como óxido nítrico e enzimas lisossômicas) e a doença se tornou mais letal. É sabido que IFN- $\gamma$  atua também na diferenciação, na troca e substituição de isotipos de anticorpos que ativam o complemento e opsonizam bactérias para fagocitose, auxiliando assim as funções efetoras do macrófago (ABBAS & LICHTMAN, 2008). A dificuldade da capacidade fagocítica pode explicar a cronicidade e dificuldade de erradicação da doença. A maioria dos estudos recentes está focando na resposta do IFN- $\gamma$  (BASTOS et al., 2013). Os neutrófilos e macrófagos são as principais células do sistema imune envolvidas na resposta contra *C. pseudotuberculosis* nos primeiros estágios da LC (JOLLY, 1966; HARD, 1975).

Outro importante fator no desenvolvimento da resposta imune contra *C. pseudotuberculosis* é a possibilidade de não produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (por estimulação dos antígenos de *C. pseudotuberculosis*) que pode estar associada à incapacidade de destruição deste patógeno, o que explicaria o desenvolvimento de infecções exclusivamente crônicas observadas em pequenos ruminantes. Neto em 2011 realizaram um experimento com camundongos C57/Black 6 selvagem e C57/Black 6 *Knockout* para o óxido nítrico (KO-NO) e comprovaram que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, já que todos os animais testados morreram após o desafio com a amostra virulenta de *C. pseudotuberculosis* na dose de  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Os macrófagos produzem NO, um composto químico que está relacionado, entre outros fatores biológicos, com a reação do sistema imune, atuando como agente na eliminação de patógenos intracelulares (VILHENA, 2006). O óxido nítrico liberado pela célula é tóxico e pode matar também microorganismos que estiverem próximos ao macrófago (MAYER, 2006).

## 2.5 Diagnóstico, tratamento e profilaxia

O diagnóstico da LC consiste basicamente em observação de achados clínicos, exame físico e laboratorial (ALEMAN & SPIERS, 2001). A cultura bacteriana é a principal técnica para detecção da bactéria *C. pseudotuberculosis* em animais infectados. O cultivo do material proveniente de conteúdo dos abscessos permite a análise microbiológica deste material.

Langenegger & Langenegger (1991) referem diferentes técnicas indiretas propostas ao longo dos anos para o diagnóstico da LC, entre as quais os testes sorológicos: soroneutralização para anti-toxinas do *C. pseudotuberculosis*, imunodifusão em gel de ágar, hemaglutinação indireta, fixação de complemento e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Outro teste também considerado para diagnóstico de LC é o teste alérgico (imunidade mediada por células).

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é sensível, *in vitro*, a vários antibióticos, entre eles, penicilina, ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina e tetraciclina (CAMPBELL et al., 1982). Porém, o uso desses antibióticos *in vivo* é ineficiente, devido à incapacidade de penetração na densa camada caseosa dos abscessos, e pela viabilidade intracelular da bactéria (o que impede o contato com quantidades substanciais de antibiótico) (COSTA, 2002). O tratamento indicado é a abertura e drenagem do conteúdo do abscesso e posterior assepsia com iodo 10% interna e externamente, antes que o abscesso fistule e contamine o ambiente e infecte animais sadios. A ferida deve ser mantida sempre com curativo (gaze imersa em iodo 10%) e trocado a cada 24 horas. Todo o procedimento deve ser repetido pelo menos 2 vezes (ALVES et al., 1997). O tratamento é indicado quando linfonodos superficiais são acometidos. A extirpação cirúrgica dos linfonodos não é recomendável, já que a retirada de um órgão de defesa predis põe a disseminação linfática e infecções de outros órgãos (SMITH, 2003).

A identificação dos animais infectados e sua remoção do rebanho são os métodos mais efetivos para o controle da LC (ALVES, 2007). O principal aspecto relacionado ao controle

da LC é isolamento imediato dos animais afetados e na remoção do material infectante antes do rompimento do abscesso e da contaminação ambiental. Métodos básicos de prevenção devem ser adotados para evitar que o rebanho desenvolva a doença, como higienização dos currais e instrumentos utilizados no manejo, cuidados especiais com objetos que possam provocar lesões cutâneas (porta de entrada do microorganismo). Os animais que apresentarem lesões sugestivas de LC devem ser isolados dos demais. Cuidados na aquisição de novos animais e uso do quarentenário é também considerado importante para a profilaxia da LC, conforme Bogdan (1997) Smith (2003) Belchior (2006) Fontaine e colaboradores (2006).

A vacinação é considerada também como ação de profilaxia e reduz a ocorrência de abscessos no rebanho em até 70% (BAIRD & FONTAINE, 2007). Porém, isoladamente, não erradica a doença em áreas endêmicas, conforme descrito por Belchior (2006). A maioria das vacinas contra LC comercializadas são combinadas com outros patógenos, são eles: *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* e *Clostridium Chauvoei* (STANFORD et al., 1998). Estas vacinas são chamadas de toxóides e são obtidas a partir da inativação da fosfolipase D (DORELLA et al., 2006). No Brasil, no ano de 2000, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) licenciou a vacina 1002 Atenuada® contra a LC, fabricada pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA. Esta vacina foi formulada a partir da amostra 1002 de *C. pseudotuberculosis* e pode conferir 83,3% de proteção em caprinos segundo estudos realizados por Ribeiro e colaboradores (1991). No entanto, esta vacina não vem fornecendo os mesmos índices a campo (DORELLA et al., 2006). Apesar de grandes avanços obtidos com a utilização das vacinas clássicas contra a LC, elas apresentam algumas desvantagens, como capacidade de causar lesões ou abscessos no sítio de aplicação. Para sanar parte dessas dificuldades, além das formas já disponíveis, encontram-se em estágio experimental as vacinas à base de peptídeos, as que utilizam microorganismos vivos recombinantes e as vacinas de terceira geração ou também conhecidas como vacina de DNA.

## 2.6 Vacinas de DNA

A vacina de DNA baseia-se no uso de sequências do material genético do agente patogênico que codificam antígenos. A estrutura da vacina de DNA inclui a clonagem de genes ou fragmentos de genes relacionados à virulência ou patogenicidade de um microrganismo em DNA plasmídeo ou em vetores virais. Este plasmídeo é inserido em uma bactéria, geralmente *Escherichia coli*, por transformação bacteriana. A bactéria ao se replicar,

permite que o plasmídeo se reproduza em larga escala, o que é fundamental para a produção da vacina. (RODRIGUES et al., 2004). Quando administrados ao indivíduo, esse DNA permite a produção da proteína antigênica pelas próprias células do indivíduo vacinado e é capaz de induzir resposta imune específica celular e humoral com memória (SRIVASTAVA, 2003). Muitas vezes um gene de resistência a antibióticos são usados, já que facilita a seleção do plasmídeo durante a produção em bactérias. Sítios para aumentar a potência das vacinas de DNA são também manipulados. Por exemplo, genes de citocinas adicionais de codificação ou moléculas co-estimulatórias podem ser adicionados com o gene para o antígeno (LIU, 2003).

Um dos primeiros relatos de expressão *in vivo* de DNA injetado foi feito por Nicolau e colaboradores em 1983. Nesse ensaio foi demonstrada a produção de insulina em camundongos imunizados com DNA em lipossomos. Em 1986 Benvenisty & Reshef demonstraram a expressão de vários antígenos, como da Hepatite B, após administrar plasmídeos em camundongos. Wolff e colaboradores desenvolveram em 1990 um estudo relacionado à  $\beta$ -galactosidase. Neste estudo foi demonstrada a expressão *in vivo* da  $\beta$ -galactosidase após a administração de plasmídeo contendo um gene repórter a esta enzima, além de avaliar fatores que determinam a eficiência da transferência do gene e da imunogenicidade conferida pela inoculação do plasmídeo. A partir destes resultados, o entendimento sobre o mecanismo imunológico induzido por este tipo de vacina despertou interesse da comunidade científica.

A vacina de DNA é capaz de induzir resposta imune celular (T CD4+ e T CD8+) e humoral (HENKE, 2002).

Como a vacina de DNA geralmente é administrada via intramuscular, o miócito é a primeira célula que entra em contato com o material genético fornecido. Por não possuir moléculas co-estimulatórias, apesar de conseguir apresentar o antígeno processado, não é capaz de ativar linfócitos T. Assim, o que se propõe é que essa célula, após codificar o antígeno, libere-o no meio extracelular. Os antígenos secretados extracelularmente podem induzir a ativação de linfócitos B (produção de anticorpos), ou podem ser endocitados por células apresentadoras de antígenos (APC's). Os fragmentos oriundos da endocitose (após ser secretado por miócitos) são chamados de antígenos exógenos. Estes antígenos são complexados com moléculas da classe II e apresentados na superfície das células apresentadoras para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4 auxiliares. O DNA que é endocitado por células APC's se mantém no núcleo celular e as vias metabólicas dessas células são utilizadas para que ocorra a síntese do antígeno protéico. Esses fragmentos resultantes são complexados à moléculas de classe I que são codificadas por genes do

complexo de histocompatibilidade I (MHC I). Estes peptídeos são, então, apresentados na superfície celular para reconhecimento e ativação de linfócitos T CD8 citotóxicos. (KOWALCZYK et al., 1999, VAN TIENHOVEN et al., 2001; NAGATA et al., 2004)

Após a apresentação pelas APC's, citocinas como interleucina 12 (IL-12) são produzidas. A IL-12 é responsável pela estimulação de diferenciação de células T virgens em células Th1 efectoras que estimulam a produção de IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  produzido pelo linfócito Th1 é uma importante citocina moduladora de células B para a secreção de IgG2a antígeno específico. Em muitas infecções por microrganismos intracelulares em camundongos a resposta humoral é caracterizada pelo predomínio dessa imunoglobulina (COUTELIER et al., 1991, NAGATA et al., 2004).

## 2.7 Vacina de DNA contra *C. pseudotuberculosis*

Em 1999 Chaplin e colaboradores investigaram a resposta imune de animais vacinados com uma vacina de DNA contra *C. pseudotuberculosis*. Essa vacina expressava fosfolipase D atenuada geneticamente junto ao domínio extracelular de bovinos CTLA-4. Este se liga com alta afinidade ao antígeno de membrana B7 sobre APC's, aumentando a resposta imune humoral à vacina e Chaplin concluiu que a vacina de DNA supera a resposta humoral das vacinas atenuadas geneticamente. Recentemente, em 2011, Costa e colaboradores construíram e testaram em camundongos uma Vacina de DNA contra *C. pseudotuberculosis* onde usaram o gene *Hsp60* como produtor de antígeno. Os animais desenvolveram resposta humoral significativa (IgG1 e IgG2a), porém não suficiente para protegê-los contra a infecção.

## 2.8 Biblioteca genômica e imunovarredura

Biblioteca genômica ou biblioteca de DNA consiste em um conjunto de fragmentos de DNA que representa a totalidade de um genoma de um organismo. Esta técnica implica, entre outras possibilidades, na busca de genes candidatos com potencial imunógenos para serem aplicados à tecnologia de produção de novas vacinas. O DNA do organismo é restringido com enzimas específicas e, então, os fragmentos são inseridos em vetores virais. O vetor viral é usado como meio de inserção em organismos hospedeiros comum, normalmente *E. coli*, a modo que cada célula obtenha uma única molécula do vetor. A célula hospedeira é utilizada devido à fácil recuperação da sequência do DNA inserido, para posterior amplificação e análise (RUSSEL & SAMBROOK, 2001). A primeira sequência descrita a partir de uma biblioteca genômica foi sequenciada por Frederick Sanger (ganhador do prêmio Nobel duas

vezes) e colaboradores em 1977. A importância de seu trabalho se deu principalmente na implicação do uso de terapias gênicas.

A técnica de imunovarredura é utilizada para isolar clones que contenham regiões de interesse em uma biblioteca genômica. O principal método de pesquisa de entre os clones é a hibridização. A biblioteca inteira é colocada sobre uma superfície de uma membrana de nitrocelulose e então marcado com uma sonda específica. A célula que contém a sequência alvo pode ser então visualizada por autorradiografia, devido à hibridização com a sonda (KIM et al., 1996). Quando os clones que contêm a sequência alvo são armazenados em pools o método da PCR é eficiente para identificação de genes que contenham a sequência de interesse (RUSSEL & SAMBROOK, 2001).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABREU, S. R. O.; MOTTA, R. A.; ROSINHA, G. M. S.; FORNER, O.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; PEREIRA, R. R. B.; ROBERTO, S. C.; ELISEI, S.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; MADUREIRA, R. C. Comparação genotípica de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos do sertão de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 28, p. 481-487, 2008.

ALEMAN, M & SPIERS, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in large animals. En: Smith P, editor. **Internal Medicine**. p.1078-1084, 2001.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; PIRES, P. C. Linfadenite caseosa: patogenia, diagnóstico, controle. Sobral. **EMBRAPA-CNPC. Documentos**, 27, 1997.

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa: O estado da arte. **EMBRAPA-CNPC. Documentos**, ISSN 1676-7659; 74, 2007.

ARSENAULT, J. O.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D. O.; GALARNEAU, J.-R.; BOISCLAIR, J., SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass

condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 67–81, 2003.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**. n. 137, p. 179-210, 2007.

BATEY, R. G. Factors affecting the yield of viable cells of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a liquid medium. **Veterinary Microbiology**. v. 11, n. 1-2, p. 145-152, 1986a.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Australian Veterinary Journal**. n. 63, p. 269-272, 1986b.

BARKSDALE, L.; LINDER, R.; SULEA, I. T.; POLLICE, M. Phospholipase-D activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a distinctive marker within the Genus *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**, n.13, p. 335-34, 1981.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **Common wealth Bureau of Animal Health**, n. 32, p. 645-657, 1962.

BELCHIOR, S. E.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; JODOR, N.; JENSEN, O. Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. **Revista Veterinaria (Argentina)**. 23, p. 258-78, 2006.

BIBERSTEIN, E. L. & HIRSH, D. C. Corynebactérias; *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes*; *Rhodococcus equi*, In: Hirsh D.C. & Zee Y.C. (Ed.), **Microbiologia Veterinária**. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.119-126, 2003.

BENVENISTY, N.; RESHEF, L. Direct introduction of genes into rats and expression of the genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n.83, p. 9551–9555, 1986.

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

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

BRAITHWAITE, C. E.; SMITH, E.E.; SONGER, J. G.; REINE, A. H. Characterization of detergent soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**. n. 38, p. 59-70, 1993.

BROWN, C. C.; OLANDER H. J. ; BIBERSTEIN E. L. ; MORSE S. M. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, n. 5, p. 1116-1119, 1986.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J. Caseous lymphadenitis of goats and sheep: a review. **Veterinary Bulletin**, n.57, p.1-12, 1987.

BURREL, D.H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *Corynebacterium ovis* antitoxin. **Research in Veterinary Science**. n. 28. p. 234-237, 1981.

CABRERA P.A., IRABEDRA P., ORLANDO D., RISTA L., HARÁN G., VIÑALS G., BLANCO M.T., ALVAREZ M., ELOLA S., MOROSOLI D., MORAÑA A., BONDAD M., SAMBRAN Y., HEINZEN T., CHANS L., PIÑEYRO L., PEREZ D. & PEREYRA I. National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants *Ovis aries* as an indicator in control programmes in Uruguay. **Acta Trópica**, 85: 281-285, 2003.

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, n. 2, p. 185-188, 1965.

CAMERON, C. M.; MINNAR, J. L. Immunization of mice against *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. **Onderstepoort Journal of Veterinary**. v. 36, n. 2, p. 207-210, 1969.

CAMERON, C. M.; & ENGELBRECHT, M. M. Mechanism of immunity to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice using inactivated vaccine. **Onderstepoort Journal of Veterinary**. v.38, p.73-82, 1978.

CARNE, H. R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 51, n. 2, p. 199-212, 1940.

CARVALHO, D. M.; CASTRO, T. L. P.; SANTOS, C. S.; CARVALHO, R. D.; BASTOS, B.; BAGANO, P.; MEYER, R.; AZEVEDO, V.; PACHECO, L. G. C. Expressão Diferencial de Reguladores Transcricionais da Bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* Durante Contato com Fatores do Hospedeiro. **Diálogos & Ciência**, n. 33, p. 35-38, 2013.

CETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VENECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiol.** 88: 75-83. 2002

CHAPLIN, P. J.; DE ROSE, R.; BOYLE, J. S.; MCWATERS, P.; KELLY, J.; TENNENT, J. M.; LEW, A. M.; SCHEERLINCK, J. P. Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep, **Infection and Immunity**. 67. 6434–6438, 1999.

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

CHEVALLIER, N.; BERTHELEMY, M.; LAINÉ, V.; LE RHUN, D.; FÉMÉNIA, F.; POLACK, B.; NAESSENS, J.; LEVY, D.; SCHWARTZ-CORNIL I. B-1 like cells exist in sheep: characterization of their phenotype and behavior. **Immunology**, v. 95, n. 2, p. 178-184, 1998.

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

COUTELIER, J. P.; VAN DER LOGT, J. T. M.; HEENSSEN, F. W. A. IgG subclass distribution of primary and secondary immune responses concomitant with viral infection. **Journal of Immunology**. v.147, n.4, p.1383-1386, 1991.

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

ELLIS, J. A. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. n. 28, p. 303-316, 1991.

EUZÉBY, J. P.; GUÉRIN-FAUBLÉE, V. Étude de quelques bactéries pathogènes pour le cheval et ou les carnivores domestiques, In: Freney J., Renaud F., Hansen W. & Bollet C. **Precis de Bacteriologie Clinique**. P. 456-500, 2000.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, p. 5986-5996, 2006.

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.

HENKE, A. DNA immunization – a new chance in vaccine research? **Medical microbiology and immunology**. v.191, p.187-190, 2002.

HODGSON, A. L., BIRD, P.; NISBET, I. T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, n. 172, p.1256-1261, 1990.

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

HOUSE, R. W.; SCHOUSBOE, M.; ALLEN, J. P. *Corynebacterium ovis* (*pseudotuberculosis*) lymphadenitis in a sheep farmer: a new occupational disease in New Zealand. **The New Zealand Medical Journal**. n. 99: 659-662, 1986.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária – Outubro de 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ms&tema=pecuaria2011> publ. completa.pdf. Acesso em 05 Fev. 2013.

IVANOVIĆ, S.; ŽUTIĆ, M.; PAVLOVIĆ, I.; ŽUJOVIĆ, M. Caseous Lymphadenitis in Goats. **Biotechnology in Animal Husbandry** 25 (5-6), p 999-1007, 2009.

JOIN-LAMBERT, O. F.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J. L.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. n. 25 v.9. p. 848-851. 2006.

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

KIM, U. J.; BIRREN, B. W.; SLEPAK, T.; MANCINO, V.; BOYSEN, C.; KANG, H. L.; SIMON, M. I.; SHIZUYA, H. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. **Genomics**. n. 34.v. 2. p. 213–218, 1996.

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 response to DNA vaccine. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 55, p.751-701, 1999.

LAN, D. T.; TANIGUCHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and Immunology**. n.42, p. 863-870, 1998.

LANGENEGGER, C.H. & LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 11(1/2): 31-34, 1991.

LEHMANN, K. B. & NEUMANN, R. O. In: Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik. **Muonchen**, 1896.

LITERAK, I.; SKALKA, B.; RYCHIA, R. Danger for sheep farming Caseous lymphadenitis (pseudotuberculosis of sheep also in the Czeck Republic). **Veterinars tvi**. 44:149-151, 1994.

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.

LOVELL, R.; ZAKI, M. M. Studies on growth products of *Corynebacterium ovis*. The exotoxin and its lethal action on white mice. **Research in Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 302-306, 1966.

LIU, M. A. DNA vaccines: a review. **Journal of Internal Medicine**. n.253, p. 402-410, 2003.

LIU, D. T. L.; CHAN, W-M.; FAN, D. S. P.; LAM, D. S. C. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **British Journal of Ophthalmology**. n.89,p. 238-251, 2005.

MAYER, G. Imunidade inata (não específica). 2006. Disponível em:<<http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter1.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2011.

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis* : The major virulence factor , phospholipase D , is down regulated at 43 C. **Research in Microbiology**, v. 158, 2007.

MCNAMARA, P. J.; BRADLEY, G. A.; SONGER, J. G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**. n. 12, p. 921-930, 1995.

MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A., Bacteriología y Virología Veterinarias. **Acribia**, Ed. 3. p. 437-452, 1975.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. 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. *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: aspectos da prevalência, da imunidade e do imunodiagnóstico. 2004. 141 f. Tese (Doutorado em Imunologia)-**Universidade Federal da Bahia**, Salvador, 2004.

MEYER, R.; REGIS, L. F.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREITE, S. M. *In vitro* IFN-gamma production by goat blood cells, after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 15, n. 34, p. 249-254, 2005.

MILLS, A. E.; MITCHELL, R. D.; LIM, E. K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. **Pathology** v. 29 p. 231-233, 1997.

MUCKLE, C. A. & GYLES, C. L. Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. **American Journal of Veterinary Research**, n. 44, p. 1149-1153, 1983.

MUCKLE, C. A.; MENZIES, P. I.; LI, Y.; HWANG, Y. T.; VAN WESENBEECK, M. Analysis of the immunodominant antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, n. 30, p. 47-58, 1992.

NAGATA, T.; AOSHI, T.; UCHUIMA, M.; SUZUKI, M.; KOIDE, Y. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper T lymphocyte oriented DNA vaccination. **DNA and Cell Biology**. v.23, n.2, p.93-106, 2004.

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

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, p. 187-189, 2000.

NETO, M. G. O. Avaliação da influência do óxido nítrico durante a infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal da Bahia**. Instituto de Ciências da Saúde, 2011.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; MEYER, R. SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 3, n. 1, p. 44-52, 2004.

PATON, M. W.; SUTHERLAND, S. S.; ROSE, I. R.; HART, R. A.; MERCY, A. R. The spread of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection to unvaccinated and vaccinated sheep. **Australian Veterinary Journal** n.72, p. 266-269, 1995.

PATON, M. W.; WALKER, S. B.; WATT, G. F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis in flocks. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, p. 91-95, 2003.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M.; KERR, T. K. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **American Journal of Medicine**. n. 24 p. 185-191, 1997.

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

PEKELDER, J. J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. Diseases of Sheep. 3. ed. Iowa: **Blackwell Publishing** p. 270-274, 2000.

PIONTKOWSKI, M. D.; SHIVVERS, D. W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **American Veterinary Medical Association**. n. 212 p. 1765-1768, 1998.

PUGH, D.G. Caseous lymphadenitis. In: **Sheep & Goat Medicine Saunders**: p. 207-208. 2002.

PUGH, D. G. Clínica de ovinos e caprinos. ED.1 **Roca**, 2004.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: **Clinical Veterinary Microbiology**, Ed. 3. p.137-143, 1994.

RADOSTITS, O. M. et al. Clínica Veterinária – Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.1737, 2002.

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J. H.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; FERNANDES, G. B. Dados preliminares sobre uma vacina viva contra a linfadenite caseosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 461- 465, 1991.

RODRIGUES JÚNIOR, J. M.; LIMA, K. M.; CASTELO, A.A. M.; MARTINS, L. D. B.; SANTOS, S. A. S.; FACCIOLI, L. H.; SILVA, C. L. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.30, p.468-477, 2004.

ROHDE, K.; YATES, R. M.; PURDY, G. E.; RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. **Immunological Reviews**. 219: 37-54, 2007.

RUIZ, J.; QUINTANA, M.; BARRERA, M. Aislamiento y clasificación Bioquímica de una cepa de *Corynebacterium pseudotuberculosis* en la provincia de La Habana. **Revista Salud Veterinary**. 17:307-309, 1995.

RUIZ, J. C.; D'AFONSECA, V.; SILVA, A.; ALI, A.; PINTO, A. C.; SANTOS, A. R.; ROCHA, A. A.; LOPES, D. O.; DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PLoS One**. v. 18, n. 6(4), 2011.

RUSSELL, D. W & SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, **Cold Spring Harbor Laboratory**, 2001.

SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; BROWN, N. L.; COULSON, A. R.; FIDDES, C. A.; HUTCHISON, C. A.; SLOCOMBE, P. M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**. n. 265. p. 687–695, 1977.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in Veterinary Science**, 2010.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D.M. Subcutaneous Swellings. In: Goat Medicine. Baltimore: **Lippincott Williams & Wilkins**. p. 46-49, 1994.

SMITH, I. J.; SQUIRES, M. B.; MC GREGOR, H. Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. **Veterinary Record**. n. 140 p. 35, 1997.

SMITH, P. B. Large animal internal medicine. **St Louis: Mosby**, n.4, 2003.

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

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Microbiology**. v.5. n.4. p. 156-161, 1997.

SRIVASTAVA, I. K. & LIU, M. A. Gene Vaccines. **Annal of Internal Medicine**. v.138, n. 138, p. 550-559, 2003.

STANFORD, K.; BROGDEN, K. A.; MCCLELLAND, L. A.; KOZUB, G. C.; AUDIBERT, F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines, **Canadian journal of veterinary research**. n. 62, p.38–43, 1998.

SUTHERLAND, S. S.; SPEIJERS, E. J.; ANDRES, B. Comparisons of the exotoxins of four strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Research in Veterinary Science**. N.47. p. 190–194, 1989.

TASHJIAN, J. J.; CAMPBELL, S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study, **American Journal Veterinary Research**. .v. 44, p. 690–693, 1983.

TER LAAK, E. A.; BOSCH, J.; BIJL, G. C.; SCHREUDER, B. E. C. Double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n. 7, p. 1125-1132, 1992.

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; LEGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R.; PAULE, B., J., A.; NASCIMENTO, I.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 192-200, 2003.

VAN TIENHOVEN, E. A. E.; TEN BRINK, C. T. B.; VAN BERGEN, J.; KONING, F.; VAN EDEN, W.; BROEREN, C.P. M. Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines. **Vaccine**. v.19, p.1515-1519, 2001.

VESCHI, J. L. Linfadenite caseosa. In: VII ENCONTRO DE CAPRINOCULTORES DO SUL DE MINAS E MÉDIA MOGIANA. Espírito Santo do Pinhal. **Anais**, 2005. Disponível em <<http://www.capritec.com.br-anais>>.

VILHENA, F. S. D. S. Mecanismo de nitrosilação de ferro-porfirinas por SNAP: cinética de reação e estabilidade em ambiente aeróbico. 2006.161 f. Tese (Doutorado em Física)-**Pontifícia Universidade Católica**, Rio de Janeiro, 2006.

ZAKI, M. M. Relation between the toxogenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infects mice. **Research. Veterinary Science**, n. 20, p. 197-200, 1976.

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

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

WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGHER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**. v.247, p.1465-1468, 1990.

YOZWIAK, M. L; & SONGER, J. G. Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. **American Journal Veterinary Research**. n.54, p.3392-3397, 1993.

## ARTIGO CIENTÍFICO

### Desenvolvimento e avaliação de uma vacina de DNA contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*\*

#### RESUMO

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença zoonótica de ovinos e caprinos causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, responsável por consideráveis perdas econômicas à cadeia da caprinovinocultura. A imunoprofilaxia certificada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é a vacina 1002®, manipulada a partir de uma amostra atenuada de *C. pseudotuberculosis* que é indicada apenas para caprinos. O desenvolvimento de uma vacina de DNA é uma alternativa considerável, pois além de conferir resposta imune humoral e celular é também de baixo custo e fácil manipulação. Assim, o objetivo neste estudo foi desenvolver uma vacina de DNA contra LC, testá-la em camundongos BALB/c, avaliar a produção de anticorpos específicos e níveis de proteção conferida aos animais testados. Para isto, o gene denominado *proteína de superfície de membrana (psm)*, que produz uma proteína potencialmente antigênica, selecionado por técnica de imunovarredura de uma biblioteca de expressão de *C. pseudotuberculosis* foi usado como alvo da construção de uma vacina de DNA. Parte deste gene foi amplificado pela PCR e clonado nos plasmídeos pET28a e pcDNA3.1+ para produção de proteína recombinante *in vitro* e expressão *in vivo*, respectivamente. Grupos de cinco camundongos da linhagem BALB/c receberam quatro doses do candidato a imunógeno e associação (pcDNA<sub>psm</sub>, pcDNA<sub>psm</sub> + pCIIL-12) e doses controle (pcDNA3.1+, pCIIL-12 e PBS). Amostras sanguíneas foram coletadas após 15 dias de cada inoculação para posterior análise humoral. O ELISA indireto revelou que o candidato a imunógeno foi capaz de induzir resposta específica de IgG e subclasse IgG1 e IgG2a e os estudos de proteção mostraram que o candidato a imunógeno pcDNA<sub>psm</sub> evitou a morte de 20% dos animais testados.

Palavras - chave: Linfadenite Caseosa, Vacina de DNA, proteína recombinante, ELISA.

\*Artigo a ser submetido à revista *BMC Research Notes*.

Projeto financiado pelo Banco do Nordeste e Embrapa Gado de Corte

## INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma enfermidade zoonótica infecciosa e crônica que acomete pequenos ruminantes causando abscessos em linfonodos e vísceras (AYERS, 1977). É causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (BENHAM et al., 1962). Ocasiona prejuízos à produção, principalmente por causa da desclassificação e condenação das carcaças que se encontram infectadas ao abate (BAIRD & FONTAINE, 2007) além dos riscos à saúde da população que mantém contato com rebanho acometido pela LC (PANTON et al., 1988). O controle é laborioso, difícil e pode ser alcançado somente com a ajuda de testes sorológicos (PEKELDER & AITEKEN, 2000). Consequentemente outras opções de tratamento e imunoprofilaxia, são necessárias para controlar a LC (PINHO et al., 2009). Existem vacinas disponíveis no mercado nacional e internacional, mas nem sempre conferem proteção de maneira igualitária entre ovinos e caprinos (WILLIAMSON, 2001).

O uso da vacinação para o controle da LC foi descrito pela primeira vez por Quevedo em 1957 e no ano de 2000 a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agropecuário (EBDA), desenvolveu a vacina 1002® (única vacina brasileira exclusiva contra *C. pseudotuberculosis*), manipulada a partir de uma amostra da bactéria naturalmente atenuada, preconizada apenas para caprinos, a qual confere imunoproteção parcial (MEYER et al., 2005). Várias estratégias têm sido testadas para desenvolvimento de uma vacina eficaz contra *C. pseudotuberculosis*, dentre elas a vacina de DNA (CHAPLIN et al., 1999).

A vacina de DNA foi descrita primeiramente no ano de 1990, quando foi relatada a expressão de uma proteína em camundongos (imunização intramuscular), proveniente de um plasmídeo contendo o gene repórter que codifica a  $\beta$ -galactosidase (WOLFF et al., 1990). A administração de uma única dose de plasmídeo recombinante pode proporcionar um amplo espectro de resposta imune, incluindo a ativação dos linfócitos T auxiliares (CD4+) e linfócitos T citotóxicos (CD8+), os quais secretam citocinas e têm função reguladora na produção de anticorpos (KOWALCZYK et al., 1999, VAN TIENHOVEN et al., 2001, NAGATA et al., 2004). Por esta metodologia ainda é possível explorar o uso de diferentes formas de administração, a incorporação de genes codificando citocinas e o desenvolvimento de vacinas multivalentes (SHARMA & KHULLER, 2001).

Estudos recentes sobre o genoma da *C. pseudotuberculosis* e seus determinantes moleculares de virulência fornecem novas alternativas para formulações de vacinas mais eficazes (DORELLA et al., 2009). Uma das estratégias de busca de antígenos para uso como vacina de DNA é a varredura imunológica de uma biblioteca de expressão do patógeno em

estudo. Recentemente o nosso grupo de pesquisa, utilizando técnicas de imunovarredura de uma biblioteca de expressão de *C. pseudotuberculosis* conseguiu identificar o gene *psm* que codifica uma proteína de membrana com potencial antigênico.

Assim, o objetivo neste trabalho foi construir uma vacina de DNA contra LC, com o gene *psm* de *C. pseudotuberculosis*, e testá-la em camundongos BALB/c quanto a proteção e produção dos níveis de anticorpos específicos produzidos nos animais imunizados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Amplificação por PCR, clonagem do gene no vetor de expressão em procariotos e produção da proteína recombinante PSMr**

O gene *psm*, que possui 1677 pares de base (pb) foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* como molde. Os oligonucleotídeos foram desenhados baseados na sequência de DNA da amostra C231 de *C. pseudotuberculosis* (Acesso NCBI: [CP001829.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP001829.1)), sendo eles: 5` GGG GGA GCT CGA TCT GCC CAC TGA GAA GTT CCG 3` (Orientação *sense*) e 5` GGG GGT CGA CGA TCT CCT CGG TGC TAA AGC CCA GCC ATA C 3` (Orientação *antisense*). Os ensaios de PCR foram realizados em um volume final de 50 µL, contendo 20 ng de DNA genômico, 2 µM de cada oligonucleotídeo. O produto da PCR foi purificado e ligado ao vetor peT28a® conforme descrito no protocolo do fabricante. O plasmídeo recombinante (pET28aPSM) foi então introduzido em células competentes *E. coli* TOP10, e uma colônia recombinante foi selecionada. O DNA plasmídeo foi extraído das células por meio do kit comercial Wizard miniprep™ (Promega®). A presença do inserto no plasmídeo foi confirmado por sequenciamento automático, utilizando o kit Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle (Invitrogen®). O plasmídeo recombinante foi introduzido em célula competente *E. coli* BL21 star e induzidas com Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 1mM, por incubação a 37°C, por três horas a 244 g. A expressão do gene foi verificada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, corado com azul brilhante de *Comassie*. A proteína, insolúvel, foi então tratada com 15 mL de tampão de lise com uréia, pH 8,0, a suspensão bacteriana foi recuperada e o sedimento foi tratado com 15 mL de tampão de lise com uréia, pH 8,0 e ruptura ultra-sônica. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi submetido à cromatografia de afinidade em resina metálica, em condições desnaturantes, com a coluna de agarose níquel *His trap HP*® (GE Healthcare®) de acordo com as instruções do

fabricante. Após diálise em PBS (tampão fosfato salino) por 72 horas, a 4°C, a proteína recombinante foi avaliada por SDS-PAGE 12% e *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-histidina e revelado com DAB.

### **Construção da vacina de DNA no vetor pCDNA3.1+**

O gene *psm* foi amplificado utilizando os iniciadores que contêm sítios de restrição e a sequência de consenso de Kozak no iniciador: 5`ATA AGA AGC GGC CGC ACC ATG GAT CTG CCC ACT GAG AAG TTC 3` (orientação *sense*) e 5` CTA GTC TAG AGA TCT CCT CGG TGC TAA AGC CCA GCC ATA C 3` (orientação *antisense*) que incluem as regiões de restrição *Xba* I e *Not* I, respectivamente. O produto de PCR foi então purificado e ligado ao vetor pCDNA3.1+® conforme instruções do fabricante. O plasmídeo recombinante (pcDNA*psm*) foi introduzido em células competentes *E. coli* TOP10, e uma colônia recombinante foi selecionada. O DNA plasmidial foi extraído por meio do o kit comercial Wizard miniprep™ (Promega®) e posteriormente confirmado por sequenciamento, (utilizando o kit Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle - Invitrogen®) e por reação de restrição com enzima *Xba* I (para linearização do plasmídeo), e *Eco* RI (que restringe o plasmídeo na região 14pb e no gene 722pb). O plasmídeo vazio (pCDNA3.1+, utilizado como controle), plasmídeo recombinante (pcDNA*psm*) e um plasmídeo recombinante que expressa a IL-12 (pCI-IL12) foram introduzidos em *E. coli* TOP10 competente, separadamente, e colônias individuais foram selecionadas. Tais plasmídeos foram purificados usando o Kit EndoFree Giga (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A concentração do DNA e a pureza foram determinadas por absorvância a 260 e 280 nm. Os plasmídeos recombinantes e controle foram diluídos em solução salina estéril para a concentração final de 1 µg/µL.

### **Isolamento de RNA e detecção de mRNA de *psm* por RT-PCR**

Para a avaliação da expressão *in vivo* do gene *psm*, um grupo composto por quatro camundongos fêmeas de 6 á 8 semanas de idade da linhagem BALB/c, receberam uma única dose pela via intramuscular de 100 µg do pcDNA*psm* e PBS (controle). Os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, 48 horas, 72 horas e sete dias após receberem a dose única de DNA, e uma porção do músculo quadríceps direito (região onde receberam as inoculações) foi coletada de cada camundongo para a extração de RNA total. As amostras foram tratadas com o reagente trizol (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) e o RNA total foi isolado de acordo com instruções do fabricante. Subsequentemente, o RNA foi extraído com clorofórmio e precipitado com álcool isopropílico. O RNA total extraído foi, então, dissolvido

em água livre de nuclease (Invitrogen) e quantificado utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop®. Antes de realizar o procedimento de transcrição reversa, o RNA total (1-10 µg) foi tratado com a enzima *Amplification grade* DNase I (Invitrogen®), e após a constatação da qualidade e pureza do RNA extraído das amostras de músculo, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada com até 10 µg de RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa do sistema ImProm-II™ Reverse Transcription System–Promega®, seguindo as instruções do fabricante. Para a amplificação do cDNA específico, 5 µL de cDNA foi utilizado como molde em uma reação de 50 µL. Foram usados 10 pmoles dos pares de oligonucleotídeos específicos, dNTPs 0,2 mM, tampão da Taq DNA polimerase 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e Taq DNA polimerase 0,5 unidade. A reação foi submetida a uma etapa de desnaturação à 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores à 55°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 4 minutos.

### **Inoculação e desafio**

Fêmeas de camundongos BALB/c de 6 à 8 semanas de idade foram divididas em 6 grupos de 5 animais, correspondentes aos grupos que receberam: pcDNA<sub>Apsm</sub>, pcDNA<sub>Apsm</sub> + pCIIL-12 (plasmídeos vacinais) e pCIIL-12, pcDNA3.1+ e PBS (controles). Cada animal foi inoculado com três doses, de 100 µg, por injeção intramuscular, (50 µg em cada músculo quadríceps) com intervalo de 15 dias e uma quarta dose 30 dias após a terceira inoculação. As amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção do plexo retro-orbital 15, 30 e 45 dias após a primeira inoculação. Todos os animais foram desafiados por via intraperitoneal 30 dias após a quarta inoculação com uma dose infecciosa de 10<sup>7</sup> UFC da amostra de CBO 28033 de *C. pseudotuberculosis* isolada de lesões de ovinos da cidade de Sobral-CE. Após o desafio, os camundongos foram monitorados diariamente e o efeito protetor do candidato pcDNA<sub>Apsm</sub> foi observado por avaliação da taxa de sobrevivência dos animais imunizados durante 21 dias. Este experimento foi realizado duas vezes para confirmar os resultados. Os dados são resultantes das médias entre os dois experimentos.

### **Deteção de anticorpos antígeno-específicos IgG utilizando ELISA**

A resposta imune humoral foi avaliada pela detecção de anticorpos da classe IgG, por meio de ELISA indireto (padronizados previamente para determinação das concentrações

ótimas de antígenos, diluições de soro e conjugado por titulação cruzada). O antígeno PSMr foi adsorvido (2,5 µg/mL) em placas de poliestireno de 96 poços (Costar 3590), diluídos em tampão carbonato bicarbonato, pH 9,6, por 12 horas à 37°C. As placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de tampão fosfato com 0,1% de tween 20 (PBST) e 5% de leite desnatado, pH 7,2, por 1 hora a 37°C. Após cinco lavagens com PBST, 100 µL/poço dos soros, diluídos (1:50) em PBST com 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé), foram incubados por 1 hora a 37°C. As placas foram então lavadas mais cinco vezes com PBST, e foi adicionado 100 µL/poço de conjugado anti-IgG mouse com peroxidase (Sigma, A5295), diluído em PBST a 1:10.000. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C, e após cinco lavagens com PBST, 100 µL/poço do cromógeno/substrato TMB (Sigma, P9187) foram adicionados. As reações foram paradas pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5N) e os resultados obtidos em leitor EL-800 (Bio-Tek), com filtro de 450 nm.

### **Deteção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2a utilizando ELISA**

A realização dos ensaios de ELISA para deteção das subclasses de IgG foram desenvolvidas como descrito anteriormente. Resumidamente, o antígeno PSMr foi adsorvido (2,5 µg/mL) em placas de poliestireno de 96 poços (Costar 3590) diluídos em tampão carbonato bicarbonato, pH 9,6, por 12 horas à 37°C. Após as lavagens dos poços, o bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com 100 µL de PBS contendo 10% de soro fetal bovino (PBS-SFB) e após nova lavagem, os poços receberam 100 µL de amostras de soros diluídas, em PBS-SFB a 1:50. Após incubação das placas e lavagem, os poços receberam anticorpos biotinizados anti-IgG1 e anti-IgG2a (BD Pharmingen) diluídos a 1:500 e incubadas por 2 horas, seguido de incubação de 45 minutos com estreptoavidina conjugada a peroxidase (R&D Systems). As placas foram lavadas oito vezes. Os poços receberam então 100 µL de substrato TMB preparado com 1 mL de TMB a 1 mg/mL em DMSO, 9 mL de tampão citrato-fosfato a 0,05 M, pH 5.5 (fosfato de sódio dibásico 0,2 M - Isofar, ácido cítrico 0,1M - Sigma e 2 µL de peróxido de hidrogênio 30% P.A – Isofar. Passados 15 minutos, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido fosfórico (Quimex) a 1:20 (v/v).

## Análise estatística

Todos os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (SD) e analisados utilizando GraphPad Prism, versão 6.0, para o Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). As diferenças estatísticas entre os grupos foram identificados usando ANOVA com um fator.

## Ética no uso de animais

Este estudo foi submetido e aprovado (processo 288/2013) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS).

## RESULTADOS

### Produção de proteína recombinante PSMr

O fragmento correspondente à região codificante do gene *psm* foi amplificada pela PCR, gerando um produto de 1677 pb. O plasmídeo recombinante pET28aPSM foi confirmado por sequenciamento automático e por dupla digestão (*Sac* I/*Sal* I) e o fragmento correspondente ao gene *psm* foi liberado do plasmídeo (Figura 1).

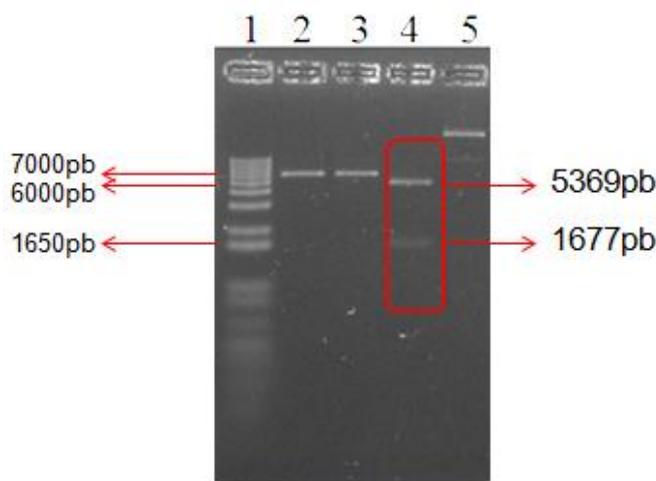


Figura 1: **Análise de reação de restrição com plasmídeo recombinante pET28aPSM utilizando enzimas de restrição *Sac* I e/ou *Sal* I.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *Syber Gold*. DNA plasmídeo recombinante (pET28aPSM) extraído por meio do kit comercial Wizard miniprep™ (Promega®). Canaleta 1 - Marcador Molecular 1kb plus Invitrogen®. Canaleta 2 - Reação de restrição com plasmídeo recombinante pET28aPSM e enzima *Sac* I. Canaleta 3 - Reação de restrição com plasmídeo recombinante pET28aPSM e enzima *Sal* I. Canaleta 4 - Reação de dupla digestão com plasmídeo recombinante pET28aPSM e enzimas *Sac* I/*Sal* I. Canaleta 5 - pET28aPSM não digerido.

Na análise da expressão do gene por eletroforese em gel de SDS-PAGE foi possível observar a PSMr com aproximadamente 100 Kilodaltons (kDa) (Figura 2). No *Western blot*, a proteína recombinante foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti histidina, confirmando a expressão do gene *psm* (Figura 3). A proteína foi quantificada conforme Bradford et al (1976).

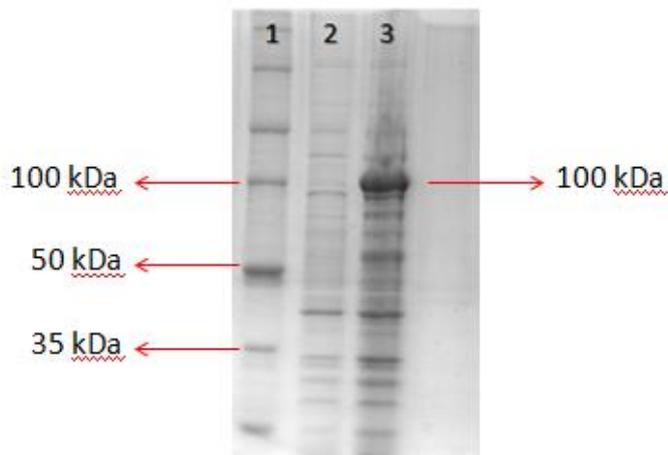


Figura 2: **Análise de expressão de proteína recombinante PSMr.** Eletroforese em gel SDS-PAGE – 12% corado em azul brilhante de *Comassie*. Expressão da proteína PSMr de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *E. coli* BL 21 star transformada com plasmídeo recombinante pET28aPSM. Canaleta 1 – Marcador de proteína Biolabs®. Canaleta 2 – Indução pET28aPSM, 0h sem adição de IPTG. Canaleta 3 - Indução pET28aPSM, por 3h à 1mM de IPTG.

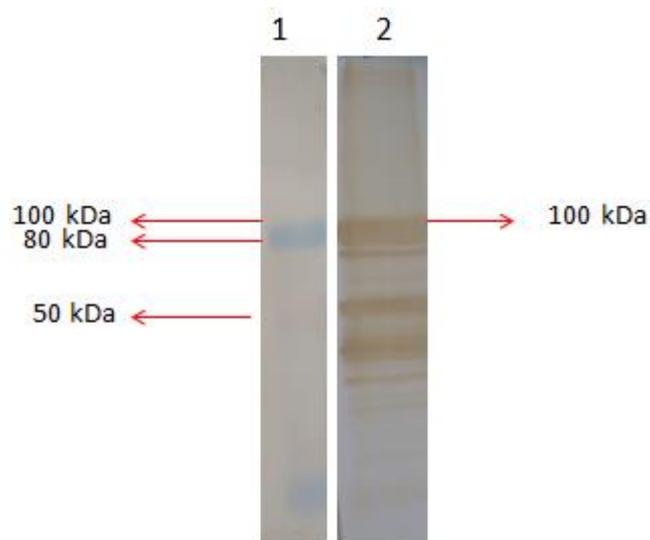


Figura 3: **Análise de expressão de proteína recombinante PSMr.** Eletroforese em gel SDS-PAGE – 12% corado em azul brilhante de *Comassie* transferida a membrana de nitrocelulose e reagida com anticorpo monoclonal *anti-histidina* e revelada com DAB. Expressão da proteína PSMr de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *E. coli* BL 21 star transformada com plasmídeo recombinante pET28aPSM. Canaleta 1 – Marcador de proteína Neb Color Biolabs®. Canaleta 2 – Indução pET28aPSM por 3h à 1mM de IPTG.

### Construção vacinal

A construção vacinal *pcDNA<sub>psm</sub>* foi confirmada por sequenciamento automático e quando submetido a reação de restrição com a enzima *Xba* I obteve um perfil eletroforético de aproximadamente 7008pb, que condiz com o tamanho da construção. Na reação de restrição com a enzima *Eco* RI, o perfil eletroforético apresentou liberação de fragmento de aproximadamente 700 pb, correspondente as restrições entre região 14pb do *pcDNA3.1+* e 722 pb do gene *psm*, confirmando assim a construção do plasmídeo vacinal (Figura 4).

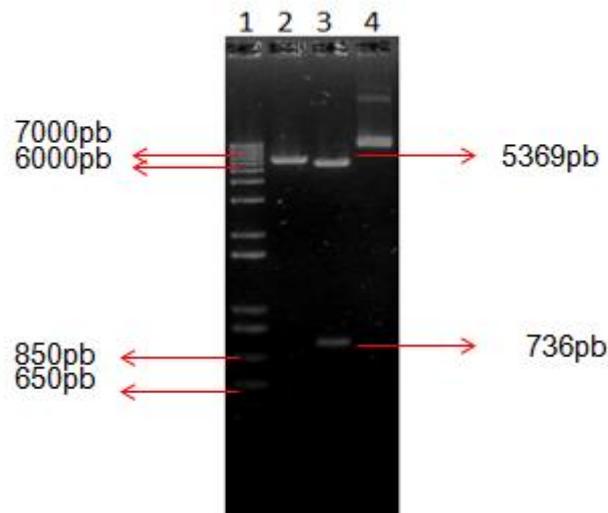


Figura 4: **Análise de reação de restrição com plasmídeo recombinante *pcDNA<sub>psm</sub>***. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *Syber Gold*. DNA plasmideal recombinante (*pcDNA<sub>psm</sub>*) extraído por meio do kit comercial Wizard miniprep™ (Promega®) submetidos a reações de digestão utilizando enzimas de restrição *Xba* I ou *Eco* RI. Canaleta 1 - Marcador Molecular 1kb plus Invitrogen®. Canaleta 2 – Reação de restrição com plasmídeo recombinante *pcDNA<sub>psm</sub>* e enzima *Xba* I. Canaleta 3 - Reação de restrição com plasmídeo recombinante *pcDNA<sub>psm</sub>* e enzima *Eco* RI. Canaleta 4 – *pcDNA<sub>psm</sub>* não digerido.

### Mensagem vacinal

O RNA total dos músculos de camundongos que receberam a candidato *pcDNA<sub>psm</sub>* foi obtido e a presença da mensagem vacinal foi detectada por RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene *psm* (Figura 5).

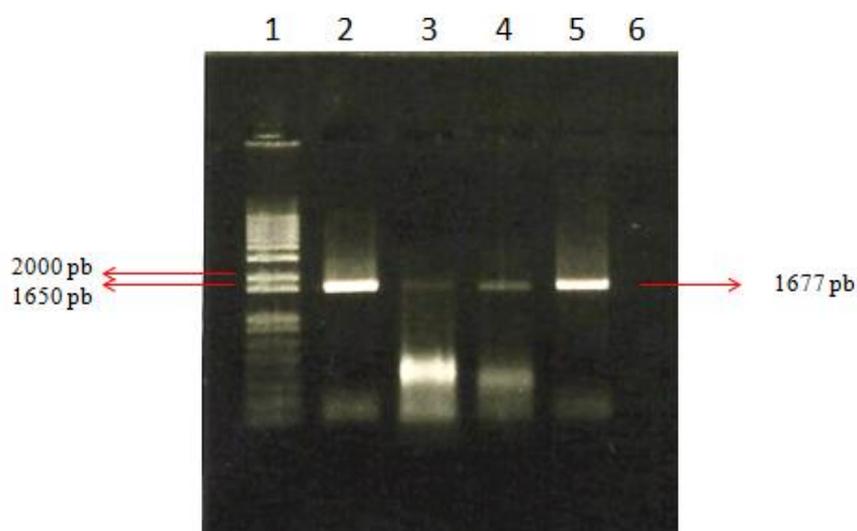


Figura 5: **Análise do produto de 1677 pb amplificado pela RT-PCR.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado em *Syber Gold*. RT-PCR com cDNA obtido a partir do RNA total extraído de músculos de animais injetados com 100 µg de *pcDNA<sub>psm</sub>* (plasmídeo vacinal) e PBS (controle). Canaleta 1 – Marcador molecular 1kb plus Invitrogen®. Canaleta 2 – Controle positivo (DNA de *C. pseudotuberculosis*). Canaleta 3 – cDNA referente ao animal eutanasiado após 48h da inoculação. Canaleta 4 - cDNA referente ao animal eutanasiado após 72h da inoculação. Canaleta 5 - cDNA referente ao animal eutanasiado após sete dias da inoculação. Canaleta 6 – Controle negativo (grupo PBS).

### Resposta de anticorpos anti-PSMr

Com base nas médias de densidade óptica foi possível observar que a produção de anticorpos IgG estimulados pelo candidato a imunógeno *pcDNA<sub>psm</sub>* obteve níveis significativos ( $p < 0,05$ ) quando comparado a resposta induzida pelos demais grupos (*pcDNA<sub>psm</sub>* + *pCIIL-12*, *pCIIL-12*, *pcDNA3.1+* E PBS) após a terceira inoculação. O soro proveniente das coletas após primeira e segunda inoculações foi também submetido ao teste ELISA (dados não mostrados), porém, apenas após a terceira inoculação foi possível detectar níveis significativos de IgG (Figura 6).

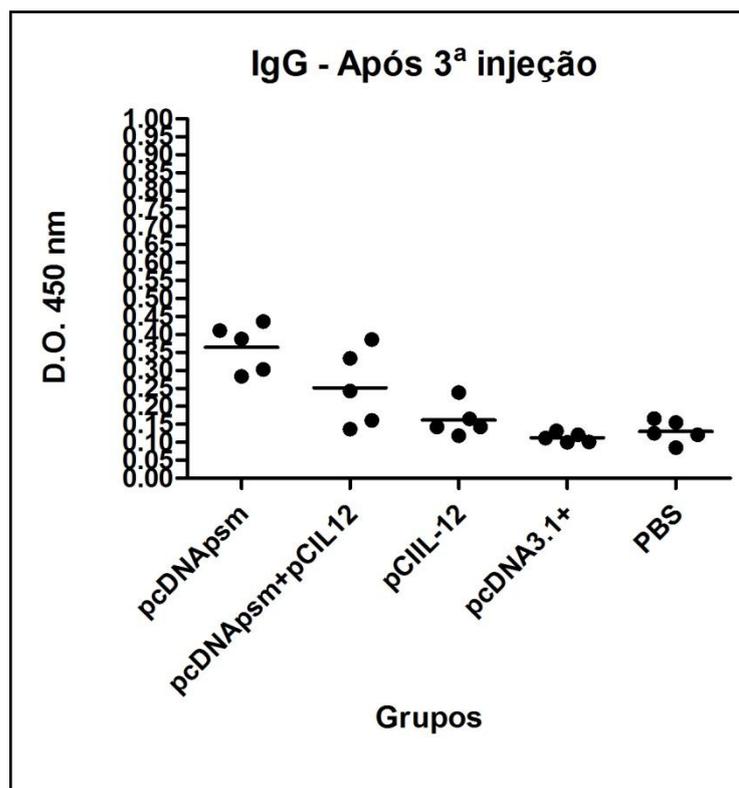


Figura 6 – Avaliação da produção de anticorpos da classe IgG reativos a PSMr, de animais injetados com plasmídeos vacinais. Camundongos BALB/ foram submetidos a três inoculações com PBS ou com 100 µg de pcDNApsm, pcDNApsm + pCI-IL12, pCI-IL12 e pcDNA3.1+, por via intramuscular. Amostras de soro, obtidas 15 dias após cada inoculação. Soro diluído à 1:50 para a detecção de anticorpos IgG e avaliadas, em duplicata, em placas de microtitulação de 96 poços pré-sensibilizadas com 100 µL PSMr (2,5 µg/mL). Análise de IgG com amostras de soro de camundongos após terceira inoculação. Os dados são expressos como média ± S.D. Grupo referente à inoculação pcDNApsm difere estatisticamente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

Para análise de subclasses de IgG soros pré-imune dos animais do grupo controle foram utilizados como controle negativo. A análise das amostras após 15 dias da terceira inoculação mostrou que os animais que receberam o candidato a imunógeno pcDNApsm apresentou resposta de IgG1 significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos demais animais dos grupos controles (pcDNApsm + pCIIL-12, pCIIL-12, pcDNA3.1+ e PBS) (Figura 7). A comparação das respostas, para IgG2a mostra que o grupo que recebeu as inoculações com o candidato a imunógeno pcDNApsm diferiu estatisticamente dos grupos controles (pCIIL-12, pcDNA3.1+ e PBS), não houve diferença estatística entre o grupo pcDNApsm e pcDNApsm + pCIIL-12. O grupo e pcDNApsm + pCIIL-12 diferiu estatisticamente dos grupos pcDNA3.1+ e PBS.

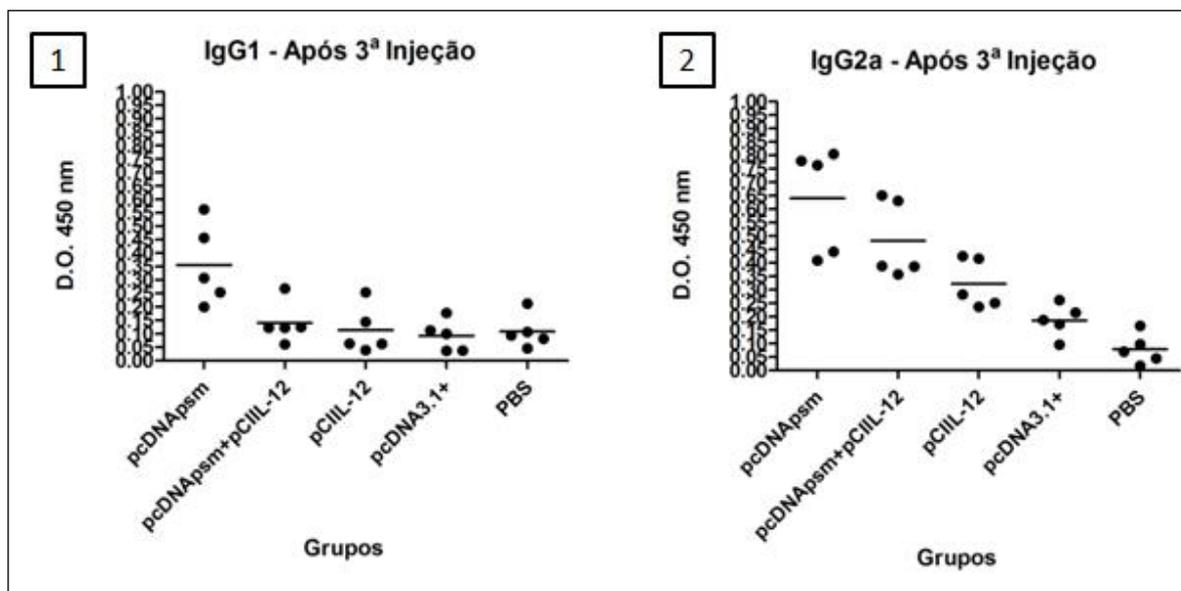
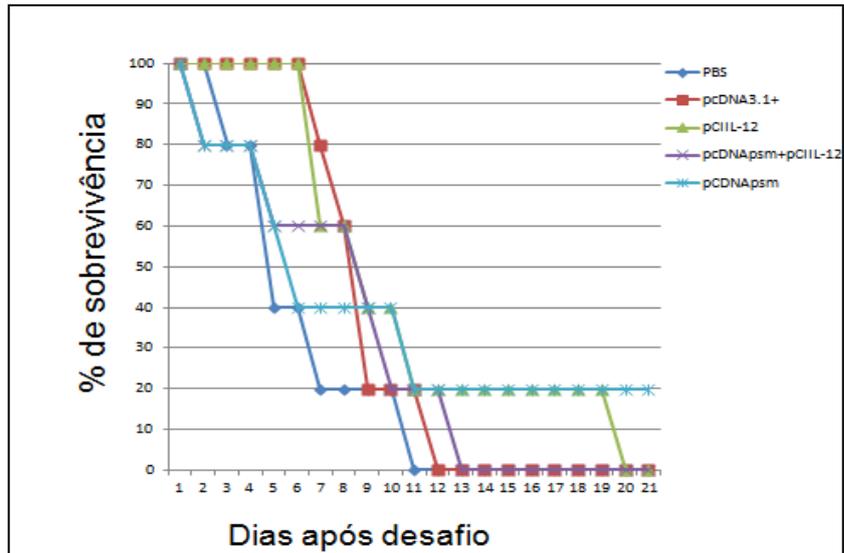


Figura 7 – Avaliação da produção de anticorpos de subclasse IgG1 e IgG2a reativos a PSMr, de animais injetados com plasmídeos vacinais. Camundongos BALB/ foram submetidos a três inoculações com PBS ou com 100 µg pcDNA<sub>psm</sub>, pcDNA<sub>psm</sub> + pCI-IL12, pCI-IL12 e pcDNA3.1+, por via intramuscular. Amostras de soro obtidas 15 dias após a cada inoculação. Soro diluído à 1:50 para a detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a e avaliadas, em duplicata, em placas de microtitulação de 96 poços pré-sensibilizadas com 100 µL PSMr (2,5 µg/mL). Gráfico 1 – Análise de IgG1 com amostras de soro de camundongos após terceira inoculação. Grupo referente à inoculação pcDNA<sub>psm</sub> difere estatisticamente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Gráfico 2 – Análise de IgG2a com soro de camundongos após terceira inoculação. Grupo referente à inoculação pcDNA<sub>psm</sub> difere estatisticamente dos grupos referente às inoculações pCIIL-12, pcDNA3.1+ e PBS (controles) e não difere do grupo pcDNA<sub>psm</sub> + pCI-IL12, este difere dos grupos pCIIL-12 e PBS ( $p < 0,05$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  S.D.

### Estudos de proteção

O estudo da proteção estimulada pelo candidato à imunógeno foi realizado em modelo murino. Todos os animais dos grupos pcDNA<sub>psm</sub>, pcDNA, pcDNA<sub>psm</sub> + pCII-L12, pCIIL-12 e PBS começaram a apresentar sinais clínicos típicos de infecção por *C. pseudotuberculosis* 48 horas após o desafio com a amostra virulenta CBO 28033. Todos os animais do grupo PBS morreram 11 dias após o desafio com a amostra CBO 28033 e os animais dos grupos pcDNA, pcDNA<sub>psm</sub> + pCIIL-12, pCIIL-12 morreram entre 15 e 20 dias após infecção. Do grupo que recebeu pcDNA<sub>psm</sub> um dos cinco animais que sobreviveram ao período de análise (20%) (Figura 8). Os sinais clínicos apresentados pelos animais são típicos de infecção por *C. pseudotuberculosis*: piloereção, anorexia progressiva, prostração e hipotermia (Figura 9). A necropsia revelou achados típicos de desenvolvimento da LC: hepatomegalia, esplenomegalia, abscessos internos em fígado, pulmão, rins, baço e intestinos, cianose e ascite (Figura 10).



**Figura 8 – Gráfico representativo de percentual de sobrevivência dos grupos imunizados, após desafio com amostra virulenta 28033 *C. pseudotuberculosis*.** Animais imunizados com quatro doses de plasmídeos vacinais (pcDNA<sub>psm</sub>, pcDNA<sub>psm</sub> + pCIIL-12) e controles (pcDNA3.1+, pCIIL-12, e PBS), e desafiados com amostra virulenta 28033 de *C. pseudotuberculosis*. Análise ao longo de 21 dias após a infecção. Os resultados são representativos de n = 5.



**Figura 9 – Animal representativo - Sinais clínicos apresentados pelos animais imunizados e desafiados com amostra virulenta 28033 *C. pseudotuberculosis*.** Animal injetado com quatro doses de plasmídeo vacinal (pcDNA<sub>psm</sub>) e desafiado com amostra virulenta 28033 *C. pseudotuberculosis*. Presença de sinais clínicos seis dias após desafio.

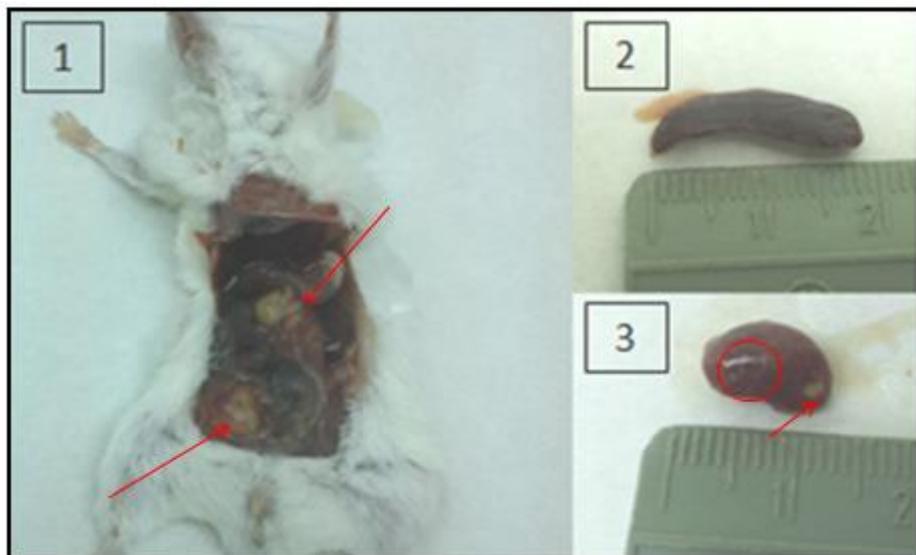


Figura 10 - **Animal representativo - Achados de necropsia apresentados pelos animais imunizados e desafiados com amostra virulenta CBO 28033 *C. pseudotuberculosis***. Animal que recebeu quatro doses de 100 µg de plasmídeo vacinal (pcDNA<sub>psm</sub>) e desafiado 30 dias após a última inoculação com a amostra virulenta CBO 28033 *C. pseudotuberculosis*. Figura 1: Aspecto geral após necropsia. A seta indica abscessos no fígado e intestino. Figura 2: Esplenomegalia. Figura 3: Abscessos e microabscessos renais.

## DISCUSSÃO

Diante da atual situação de disseminação da LC se faz necessária novas técnicas de controle e erradicação de tal doença, e é sabido que a principal técnica de controle é a imunização. A vacina de DNA tem sido apontada como ferramenta promissora para estimulação de resposta imune em longo prazo, por meio do sistema de expressão *in vivo* de antígenos (WOLFF et al., 1990, SMAHEL et al., 2002).

Sabe-se que a técnica de imunovarredura é capaz de detectar genes que tenham potencial imunogênico considerável, e por meio desta técnica foi detectado o gene *Proteína Ancorado à Superfície de Membrana*, neste estudo chamado de *psm*. Portanto, é esperado que tal gene desempenhe papel potencial no processo de reconhecimento antigênico e estímulo de resposta imune.

Este é o primeiro estudo relacionado ao gene *psm* de *C. pseudotuberculosis*, assim como é o primeiro estudo que busca a proteção contra Linfadenite Caseosa em modelo murino, por meio da vacina de DNA com tal gene. Os vetores plasmidiais são os mais utilizados para transferência gênica direta, pois apresentam maior segurança biológica, baixo custo, fácil produção, relativa estabilidade e capacidade genômica de dois a 19 kilobases, e

ainda podem ser transferidos para as células musculares além de possuírem região promotora forte (Kano et al., 2007).

O candidato a imunógeno pcDNA $_{psm}$  conferiu níveis de anticorpos específicos contra a proteína recombinante PSMr maiores quando comparados aos níveis dos grupos controles, após a terceira inoculação, porém a imunidade estimulada por seu processo não foi suficiente para que houvesse proteção dos animais durante o desenvolvimento da doença. Este dado corrobora com os dados da vacina de DNA construída por Costa e colaboradores em 2011, quando a vacina pVAX $_{hsp60}$  também conferiu níveis interessantes de anticorpos específicos, mas não protegeu os animais do desenvolvimento da doença após desafio com amostra virulenta MIC-6 de *C. pseudotuberculosis*. O mesmo gene foi usado para a produção de proteína recombinante que foi utilizada para testes como vacina de subunidade, e os resultados foram parecidos com a construção vacinal com o gene *hsp60*: os animais produziram altos níveis de IgG e IgG1, e em menor escala a subclasse IgG2a, porém estes animais não foram protegidos o suficiente para que a doença não evoluísse (PINHO et al., 2003).

Neste estudo foi possível detectar a presença de IgG1 e IgG2a em altos níveis estatisticamente, o que pode indicar que os animais estavam desenvolvendo resposta imune celular. Era esperado que grupo estudado que recebeu o candidato a imunógeno pcDNA $_{psm}$  + pCIIL-12 produzisse a interleucina 12 e que esta citocina estimulasse a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos Th1 (uma vez que IgG2a indica a produção de linfócitos Th1) e assim apresentasse proteção (maior eficácia na eliminação de bactérias) porém este grupo não apresentou diferenças no estudo de proteção quando comparado aos grupos controle e os grupos que receberam pcDNA $_{psm}$ . Os animais grupo pcDNA $_{psm}$  + pCIIL-12 morreram todos até o 13<sup>o</sup> dia após o desafio.

Neste estudo os animais que receberam doses do candidato a imunógeno pcDNA $_{psm}$ , doses da candidato pcDNA $_{psm}$  + pCIIL-12, desenvolveram a doença após o desafio com a amostra virulenta 28033 de *C. pseudotuberculosis*. Porém foi possível observar nos estudos de proteção que apesar dos animais desses grupos desenvolverem a doença, houve animais que sobreviveram aos 21 dias de análise de proteção, diferentemente dos animais do grupo PBS, que morreram ao longo dos 11 primeiros dias após infecção. O que se pode entender é que os animais que sobreviveram foram aqueles que obtiveram os níveis de anticorpos e a progressão da doença tendeu a cronicidade. Apesar dos animais sobreviverem por mais tempo, o desenvolvimento da doença progrediu e os abscessos evoluíram significativamente.

Um importante fator em relação ao potencial protetor do candidato pcDNA $_{psm}$  pode estar relacionado à dose de desafio injetada nos animais estudados. Em um estudo relacionado às doses virulentas e patogênicas realizado pelo grupo de pesquisa do laboratório de engenharia genética animal da Embrapa Gado de Corte, mostra que doses a partir de  $10^3$  UFC já é capaz de produzir lesão e morte nos animais (dados não publicados). Neste estudo a dose infectante considerada foi  $10^7$  UFC de uma amostra de *C. pseudotuberculosis* extramente patogênica, que produziu a doença e morte dos animais do grupo controle em sete dias. É interessante que se adequa a dose infectante exata de *C. pseudotuberculosis* que seja capaz de causar a doença em animais não protegidos, simulando o mais próximo possível a infecção natural.

Um dos principais problemas das vacinas de DNA é a captação do DNA plasmidial recombinante às células, sejam musculares e/ou APC's (ULMER et al., 2006). Chaplin e colaboradores em 1999 comprovaram tal complicação quando injetaram em camundongos DNA plasmidial fusionado à CTLA-4 (A função da utilização do CTLA-4 na produção de vacinas de DNA está relacionada à sua ligação ao antígeno de membrana B7, das APCs, promovendo a fusão dos antígenos aos sítios de indução da resposta imune), definindo que a resposta humoral deste ensaio é significativamente maior quando comparado à estudos com vacinas atenuadas e conferiu maior proteção pós-infecção.

Scheerlinck e colaboradores testaram a eficiência das imunizações intramusculares e eletroporação de DNA plasmidial e constataram que após imunização intramuscular a quantidade de antígeno disponível é significativamente menor quando comparado à quantidade de antígenos expressos por eletroporação. Apesar dos baixos níveis humorais induzidos na vacinação intramuscular o nível de resposta de memória foi alto. Quando foram comparadas as vias intramuscular, subcutânea e gene *gun*, a via intramuscular se mostrou mais eficiente em estimular resposta humoral, assim como proteger os animais após desafio (DE ROSE et al., 2002). Vacinas de DNA requerem uma tecnologia de entrega adequada, assim como método e a via de administração pode desempenhar um papel-chave na magnitude e qualidade da resposta imune desencadeada (INGOLOTTI et al., 2010).

O potencial de proteção por meio de vacinas de DNA está sendo extensivamente estudado contra *Mycobacterium tuberculosis* e outras bactérias. Drew e colaboradores indicam que o uso de DNA em vacinações contra infecções bacterianas pode ser complicado pelas diferenças fundamentais entre os genes de procariotos e eucariotos e de seus produtos proteicos bem como a célula diferir da maquinaria de origem do gene e assim produzir a proteína específica.

Vacinas de terceira geração têm amplas vantagens sobre as vacinas tradicionais (vivas, mortas ou atenuadas) como a simplicidade para produção, baixo custo, estabilidade, segurança, reprodutibilidade lote-a-lote e facilidade de transporte na forma liofilizada. Por esta metodologia ainda é possível explorar o uso de diferentes formas de administração, a incorporação de genes codificando citocinas e o desenvolvimento de vacinas multivalentes (SHARMA & KHULLER 2001). Isto facilita quando estas vão ser aplicadas em animais de fazenda de difícil e demorado acesso e que necessitem ficar abertas por um longo período, em virtude do grande número de animais a ser vacinados (REDDING & WEINER, 2009). Essas são características relevantes quando se pensa em vacinas de última geração e que tem como objetivo erradicar doenças, principalmente em um grande país como o nosso, que tem regiões de difícil acesso. Duas vacinas de DNA para uso veterinário foram licenciadas: uma contra o vírus da febre do Nilo do Ocidente em eqüinos e a outra contra vírus da necrose hematopoiética infecciosa em salmão (ULMER et al., 2006), o que confirma que a vacina de DNA é uma tecnologia promissora na prevenção e controle de doenças em medicina veterinária.

*Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa, ou seja, é necessária a análise do perfil da resposta imune celular para definir novos estudos, pois este trabalho mostrou que o candidato a imunógeno pcDNA<sub>psm</sub> tem grande potencial para desenvolvimento de resposta imune em animais e pode ser utilizado como ferramenta em novas pesquisas que visam o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra linfadenite caseosa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. S. F.; SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R. Linfadenite Caseosa: O estado da arte. **Documentos / Embrapa Caprinos**, ISSN 1676-7659; 74, 2007.

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 171: p.1251-1254, 1977.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**. n. 137, p. 179-210, 2007.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **Common wealth Bureau of Animal Health**, n. 32, p. 645-657, 1962.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**.v.72, p. 248-254, 1976.

CHAPLIN, P. J.; DE ROSE, R.; BOYLE, J. S.; MCWATERS, P.; KELLY, J.; TENNENT, J. M.; LEW, A. M.; SCHEERLINCK, J. P. Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep, **Infection and Immunity**. 67. 6434–6438, 1999.

COSTA, M.P.; MCCULLOCH, J. A.; ALMEIDA, S. S.; DORELLA, F. A.; FONSECA, C. T.; OLIVEIRA, D. M.; TEIXEIRA, M. F. S.; LASKOWSKA, E.; LIPINSKA, B.; MEYER, R.; PORTELA, R. W.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. 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 Reserch Notes**. n. 4, v. 243, p. 1-10, 2011.

DE ROSE, R.; TENNENT, J.; MCWATERS, P.; CHAPLIN, P. J.; WOOD, P. R.; KIMPTON, W.; CAHILL, R.; SCHEERLINCK J. P. Y. Efficacy of DNA Vaccination by differentes routes of immunization in sheep. **Veterinary immunology and immunophatology**. n.90, p. 55-63, 2002.

DORELLA, F. A.; PACHECO, C. G. L.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, A. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. **Expert Review Vaccines**.v.8, n.2, p. 205–213, 2009.

DREW, D. R.; BOYLE, J. S.; LEW, A. M.; LIGHTOWLERS, M. W.; CHAPLIN, P. J.; STRUGNELL, R. A. The comparative efficacy of CTLA-4 and L-selectin targeted DNA vaccines in mice and sheep. **Vaccine** n. 19, v. 31, p. 4417- 4428, 2001.

GARMONY, H.S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R. W. DNA vaccines: improving expression of antigens. **Genetic Vaccines and Therapy**. v.1, n.2, p.2-5, 2003.

GLETING, J.; WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. **Microbial Cell Factories**, v.4, n.26, p.1-5, 2005.

INGOLOTTI, M.; KAWALEKAR, O.; SHEDLOCK, D. J.; MUTHUMANI, K.; WEINER, D. B. DNA vaccines for targeting bacterial infections. **Expert Review Vaccines**. n.9, v. 7, p. 747–763, 2010.

KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. Immune response to DNA vaccine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.55, p.751-701, 1999.

LIU, M. A. DNA vaccines: a review. **Journal of Internal Medicine**. v. 253, p. 402–410, 2003.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. 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.; REGIS, L. F.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. M. *In vitro* IFN-gamma production by goat blood cells, after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 15, n. 34, p. 249-254, 2005.

NAGATA, T.; AOSHI, T.; UCHUIMA, M.; SUZUKI, M.; KOIDE, Y. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper Tlymphocyte oriented DNA vaccination. **DNA and Cell Biology**, v.23, n.2, p.93-106, 2004.

PANTON, M. W.; WILKISON, F. C.; GARDNER, J. J.; SUTHERLAND, S. S. The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep Aust: **Veterinary Journal**, p. 117-119, 1988.

PEKELDER, J. J. Caseous lymphadenitis. In: MARTIN, W. B.; AITEKEN, I. D. Diseases of Sheep. 3. ed. Iowa: **Blackwell Publishing** p. 270-274, 2000.

PINHO, J. M. R.; DORELLA, F. A.; COELHO, K. S.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. D.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHO, A.; AZEVEDO, V. Immunization with recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* heat-shock protein (Hsp)-60 is able to induce an immune response in mice, but fails to confer protection against infection. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 3, 22-27, 2009.

QUEVEDO, J. M. Evaluación de una vacuna contra linfadenite caseosa en la oveja. **Revista Invest.** n. 1, p. 47, 1957.

SCHEERLINCK, J. P. Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection Immunity.** .v. 67, p. 6434–6438, 1999.

SHARMA, A. K.; KHULLER, G. K. DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. **Immunology Cell Biology.** v. 79, n. 6, p. 537-546, 2001.

SMAHEL, M. 2002. DNA vaccines. **Cas Léč Cesk** n,141, p.26–32, 2002.

ULMER, J. B.; WAHREN, B.; LIU, M. A. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. **TRENDS in Molecular Medicine.** v.12, n.5, p.216-222, 2006.

VAN TIENHOVEN, E. A. E.; TEN BRINK, C. T. B.; VAN BERGEN, J.; KONING, F.; VAN EDEN, W.; BROEREN, C. P. M. Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines. **Vaccine.** v.19, p.1515-1519, 2001.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. The Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, n. 17, n. 1, p.359.371, 2001.

WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGHER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. **Science**. v. 247, p.1465-1468, 1990.

