ANA CAROLINA RUSCA CORREA PORTO

**Vacinação de potros com linhagem atenuada
de *Salmonella enterica* Typhimurium
carreando o gene *vapA* de *Rhodococcus*
equi: avaliação clínica e imunitária**

São Paulo

2010

ANA CAROLINA RUSCA CORREA PORTO

Vacinação de potros com linhagem atenuada de *Salmonella enterica* Typhimurium carreando o gene *vapA* de *Rhodococcus equi*: avaliação clínica e imunitária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2334
FMVZ

Porto, Ana Carolina Rusca Correa

Vacinação de potros com linhagem atenuada de *Salmonella enterica* Typhimurium carreando o gene *vapA* de *Rhodococcus equi*: avaliação clínica e imunitária / Ana Carolina Rusca Correa Porto. -- 2010.
139 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes.

1. *Rhodococcus equi*. 2. Potros. 3. Pneumonia. 4. Vacina. 5. Resposta imune.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Vacinação de potros com linhagem atenuada de *Salmonella enterica typhimurium* carregando o gene *Vuop A* de *Rhodococcus equi*: avaliação clínica e imunitária", protocolado sob o nº1012/2006, utilizando 20 (vinte) cavalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Immunization of foals with attenuated strain of *Salmonelle enterica typhiminuim* carrying vap A gene of *Rhodococcus equi*: clinical and immunological evaluation", protocol number 1012/2006, utilizing 20 (twenty) horses, under the responsibility Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 23 de março de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PORTO, Ana Carolina Rusca Correa

Título: Vacinação de potros com linhagem atenuada de *Salmonella enterica* Typhimurium carreando o gene vapA de *Rhodococcus equi*: avaliação clínica e imunitária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Dedico e Agradeço .....

*Aos meus pais Maria Tereza e Fernando pessoas que me ensinaram que é preciso lutar muito para vencer. Com a ajuda de vocês tem sido muito mais tranqüilo.
Obrigada por tudo.*

*Ao Rodrigo, meu marido
A capacidade de vencer é aumentada quando ha alguém por perto que estimula e incentiva. Mais do que isso, você energiza e impulsiona.
Quando não está à frente puxando, você está atrás empurrando.
Obrigada por fazer a diferença em tudo. Amo você.*

Aos amigos Luis Eduardo Ferraz e Luciana C. Ferraz por acreditarem em mim desde o princípio e principalmente por confiarem a mim esse que era um grande sonho. Muito Obrigada.

DEDICATÓRIAS

---

*Aos meus queridos potrinhos: Mumu, Baiano, Gi, Lica, Gabi, Sir, Ro, Lorinho,
Ciça, Lustrinho, Atar, Arma da Guanabara, Fatal Case, Blue Castora, Diga La,
Carolzinha e a minha preferida Nandinha...
que deram a sua vida para a realização desse trabalho
Obrigada...a minha vida continuará sendo dedicada a vocês.....*

AGRADECIMENTOS

Agradeço.....

A **Deus** pela força sem tamanho em todos os momentos que tanto precisei.
A minha tia e segunda mãe **Lalá (in memorian)** por nunca descuidar da minha “geladeira”.

A minha irmã **Camila**, que se preocupou e me consolou quando muito precisei.

A minha querida sogrinha **Glae**....que continuou me mandando marmitas incríveis sempre que podia.

A minha amiga - irmã **Janinha** pela simples existência e também por tudo de bom que ele sempre tem para me falar.

A **Yara**, amiga querida e companheira de quarto...por ter acompanhado tão de perto mais essa etapa da minha vida.

A minha querida e eterna chefinha **Maria Cristina Barreira**, sempre tão solícita e tão disposta a me ouvir e me ajudar.

Ao prof. **Wilson Roberto Fernandes**, que acreditou na minha capacidade e por ter me dado a oportunidade de realizar esse sonho.

A minha “Mama” **Ceci** que durante todo o meu doutorado foi meu suporte profissional e principalmente pessoal.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Bira**, amigo de velha data, que me recebeu de braços abertos no HOVET e sempre fez de tudo para ver esse doutorado “andando”.

Ao **Dr. Pacheco** por dividir comigo sua enorme experiência com cavalos e por me acudir prontamente sempre que precisei.

Ao grande amigo **Paulão** e sua primeira dama **Hilda** por estarem sempre presentes e por fazerem de mim a sua filha branca.

A querida amiga **Paula**, por ser uma pessoa iluminada e estar sempre pronta a me ajudar.

Aos amigos **Gerson, Wanderley, Rose, Jo e Nicinha** por toda ajuda e amizade.

Aos amigos do setor de eqüinos **Waldir e Maico** pela ajuda no começo do projeto.

Ao **Zico** pela ajuda com meus potrinhos.

Aos colegas de Ribeirão Preto: **Aline, Sandro, Silvia, Patrícia e Érica** pelo suporte imprescindível para realização desse trabalho.

A **Cida e Adelaide** pela ajuda fundamental nas partes burocráticas.

A minha estagiaria e amiga **Fernanda** que muito me ajudou e cuidou dos meus potrinhos como se fossem seus.

Aos meus grandes amigos conquistados graças a esse trabalho: **Murilo, Gabriela e Rodrigo Baiano** que foram presentes de corpo e alma.

A minha família postíça **Jairo, Lucas, Henrique e Marília** pela convivência maravilhosa e com certeza inesquecível.

A minha querida **Tia Clara** por tudo....a senhora sabe.

A minha Mama **Alminha** e a minha irmã de “alma” **Cris** por todo apoio, ajuda e paciência comigo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Tio Chico**, amigo verdadeiro e profissional maravilhoso, por todos os conselhos e colaborações.

A **Profa. Carla Belli**, profissional incrível com quem infelizmente tive pouca oportunidade de trabalhar, mas que felizmente pude conhecer.

A querida **Joyce**, amiga para qualquer hora.

A **todos os amigos** de disciplina pela agradável convivência.

Ao **Dr. Oscar (in memorian)** (Haras Pirassununga) pelo abrigo as minhas primeiras éguas.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo apoio financeiro.

A **Prefeitura de Campus da USP de Pirassununga** por permitir o desenvolvimento desse trabalho.

E a **todos** que participaram direta ou indiretamente dessa fase da minha vida.

.....Muito Obrigada.....
Carol

EPÍGRAFE

***"Uma pessoa inteligente resolve um problema, um
sábio o previne."***

Albert Einstein

RESUMO

PORTO, A. C. R. C. **Vacinação de potros com linhagem atenuada de *Salmonella enterica* Typhimurium carreando o gene *vapA* de *Rhodococcus equi*: avaliação clínica e imunitária.** [Immunization of foals with attenuated strain of *Salmonella enterica* Typhimurium carrying *vapA* gene of *Rhodococcus equi*: clinical and immunological evaluation]. 2010. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A infecção por *Rhodococcus equi* é a causa mais comum de pneumonia em potros durante os primeiros 6 meses de idade e as medidas utilizadas no controle da infecção são freqüentemente ineficientes. Os protocolos de tratamento são longos, de alto custo e nem sempre eficazes. A prevenção da rodococose através da imunização de potros com vacina eficaz e segura tem sido um desafio. Estudos recentes se baseiam na utilização da proteína A associada a virulência (VapA), que tem sido descrita como importante indutora da imunidade contra *R. equi*. Este estudo avaliou a resposta clínica e imunitária desenvolvida por potros imunizados com cepa atenuada de *S. enterica* Typhimurium capaz de expressar o antígeno VapA (grupo teste) ou apenas *S. enterica* Typhimurium sem o gene *vapA* (grupo controle), antes e após o desafio experimental. Duas etapas experimentais foram estabelecidas de acordo com a via de imunização: intranasal ou oral em até 12 horas após o nascimento e aos 14 dias de idade. Os animais do grupo teste e do grupo controle foram desafiados experimentalmente com cepa virulenta de *R. equi* 28 dias após o nascimento. Para acompanhar o desenvolvimento dos sinais clínicos, foram realizados exames clínicos, hemogramas e exames complementares de imagem. O padrão de resposta imune desenvolvida foi avaliada através da dosagem de imunoglobulinas, mensuração da expressão de citocinas, ensaio de proliferação de linfócitos, isolamento de *R. equi* e perfil citológico do LTB. As manifestações clínicas foram observadas de maneira menos intensa nos animais do grupo teste da segunda etapa experimental e óbitos decorrentes da rodococose ocorreram apenas nos animais do grupo controle (2/3). Os animais do grupo teste apresentaram uma resposta de IgGb mais intensa quando comparada aos animais do grupo controle, porém não foi observado diferença estatística. A linfoproliferação e a expressão de citocinas de padrão Th1 foram superiores nos animais do grupo teste. Em contraste, os animais do grupo controle apresentaram uma resposta caracterizada pela maior expressão da citocina IL-4. A produção de IgA local foi mais significativa nos animais imunizados com *Salmonella*

carreando *vapA*. Não foram observados efeitos tóxicos graves resultantes da imunização em nenhuma das etapas experimentais. A vacinação de potros neonatos com *S. enterica* Typhimurium expressando VapA foi considerada segura, capaz de modular eficientemente a resposta imune e aparentemente capaz de proteger contra a infecção experimental com *R. equi*.

Palavras-chave: *Rhodococcus equi*. Potros. Pneumonia. Vacina. Resposta Imune

ABSTRACT

PORTO, A. C. R. C. **Immunization of foals with attenuated strain of *Salmonella enterica* Typhimurium carrying vapA gene of *Rhodococcus equi*: clinical and immunological evaluation.** [Vacinação de potros com linhagem atenuada de *Salmonella enterica* Typhimurium carreando o gene *vapA* de *Rhodococcus equi*: avaliação clínica e imunitária] . 2010. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Rhodococcus equi is the major cause of pneumonia in foals during the first six months and control measures are frequently ineffective. Treatment protocols are long, expensive and do not always produce good results. Rhodococcosis prevention through immunization of foals using a safe and efficient vaccine is still a challenge. Recent studies are based on the use of the virulence associated protein A (vapA) which has been described as an important inducer of immunity against *R. equi*. The present study evaluated the clinical and immune response of foals vaccinated with an attenuated strain of *S. enterica* Typhimurium expressing VapA antigen (test group) or *S. enterica* Typhimurium without the *vapA* gene (control group), previous to and following experimental challenge. Two experimental phases were established according to the immunization route: intranasal or oral vaccination up to 12 hrs following birth and at 14 days of age. The experimental and control groups were challenge on day 28 with a virulent stain of *R. equi*. Clinical examination, complete hemograms and image complementary exams were used to evaluate the development of clinical signs. Immune response patterns were evaluated through immunoglobulin dosage, cytokine expression, lymphocyte proliferation essays, isolation of *R. equi* and cytological profiles of TBW. Clinical manifestation was less intense in the test group during the second experimental phase, and death occurred only in the control group (2/3) and was due to *R. equi* pneumonia. The test group produced a more intense IgGb response when compared to controls however no statistical difference was observed. Lymphoproliferation and Th1 cytokine expression were higher in the test group. In contrast, controls produced an IL-4 response. Local IgA was significantly higher in animals immunized with *Salmonella* carrying *vapA*. Immunization protocols produced no severe toxic effect. The vaccination of neonatal foals with *S. enterica* Typhimurium

expressing VapA was considered safe, produced efficient modulation of the immune response and is apparently able to protect against experimental *R.equi* infection.

Key words: *Rhodococcus equi*. Foals. Pneumonia. Vaccine. Immune Response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representativo da construção da linhagem vacinal utilizada	50
Figura 2 -	Imagem ultrassonográfica do pulmão de um animal do Grupo vapA no T6	64
Figura 3 -	Imagem ultrassonográfica do pulmão de um animal do Grupo pyA no T6.	65
Figura 4 -	Imagem ultrassonográfica pulmonar sem alterações	65
Figura 5 -	Representação da mensuração dos isotipos de imunoglobulinas eqüinas em diferentes amostras de soro obtidas de animais do Grupo vapA.	67
Figura 6 -	Representação da mensuração de diferentes isotipos de imunoglobulinas séricas eqüinas em diferentes amostras de soro obtidas de animais do Grupo pyA	68
Figura 7 -	Representação do índice de proliferação de linfócitos sanguíneos do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	69
Figura 8 -	Representação da expressão de RNAm para as citocinas IFN- γ e IL-12p40, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células mononucleares de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	71
Figura 9 -	Representação da expressão de RNAm para as citocinas IL-4 e IL-10, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células mononucleares de animais do Grupo vapA (vapA) e do Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	72
Figura 10 -	Porcentagem de células provenientes dos diferentes LTBs de animais do Grupo vapA (vapA) e Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	75
Figura 11 -	Imagem radiográfica pulmonar de um potro do Grupo vapA, 25 dias após a infecção experimental	78
Figura 12 -	Imagens radiográficas do pulmão de dois potros do Grupo pyA	79

Figura 13 - Presença de abscesso por todo o pulmão dos animais do Grupo pyA que vieram a óbito	80
Figura 14 - Representação da mensuração de diferentes isotipos de imunoglobulinas eqüinas em diferentes amostras de soro obtidas de animais do Grupo vapA	82
Figura 15 - Representação da mensuração dos isotipos de imunoglobulinas eqüinas em diferentes amostras de soro obtidas de animais do Grupo pyA	83
Figura 16 - Representação do índice de proliferação de linfócitos sanguíneos de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	84
Figura 17 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IFN- γ e IL-12p40, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células mononucleares de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	86
Figura 18 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IL-4 e IL-10, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células mononucleares de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	87
Figura 19 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IFN- γ e IL-12p40, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células do LTB de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	89
Figura 20 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IL-4 e IL-10, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células do LTB de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 21 - Concentração pulmonar de IgA expressa em absorbância corrigida dos animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) durante o protocolo experimental 92
- Figura 22 - Porcentagem de células provenientes da coleta de lavado traqueobrônquico de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental 95

Tabela 1 – Valores de “p” obtidos para comparação das concentrações dos isotipos de imunoglobulinas séricas dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2008	68
Tabela 2 - Valores de “p” obtidos para comparação dos índices de proliferação dos linfócitos sanguíneos dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2008	70
Tabela 3 - Valores de “p” obtidos para comparação da expressão de citocinas no sangue periférico dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2008	73
Tabela 4 - Presença (+) ou Ausência (-) de <i>R. equi</i> no LTB dos animais do Grupo vapA e do Grupo pyA nos diferentes tempos experimentais. Pirassununga, 2008	74
Tabela 5 - Valores de “p” obtidos para comparação da porcentagem do tipo celular recuperado do LTB dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2008	76
Tabela 6 - Valores de “p” obtidos para comparação das concentrações dos isotipos de imunoglobulinas séricas dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009	83
Tabela 7 - Valores de “p” obtidos para comparação dos índices de proliferação dos linfócitos sanguíneos dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009	84
Tabela 8 - Valores de “p” obtidos para comparação da expressão de citocinas no sangue periférico dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 9 - Valores de “p” obtidos para comparação da expressão de citocinas do LTB dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009	91
Tabela 10 - Valores de “p” obtidos para comparação das concentrações de IgA no LTB dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009	92
Tabela 11 - Presença (+) ou Ausência (-) de <i>R. equi</i> no LTB antes e depois do desafio. Pirassununga, 2009	93
Tabela 12 - Valores de “p” obtidos para comparação da porcentagem do tipo celular recuperado do LTB dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009	96
Tabela 13 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA1. Pirassununga, 2008	130
Tabela 14 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA2. Pirassununga, 2008	130
Tabela 15 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA3. Pirassununga, 2008	131
Tabela 16 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA4. Pirassununga, 2008	131
Tabela 17 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA5. Pirassununga, 2008	132
Tabela 18 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA1. Pirassununga, 2008.....	132
Tabela 19 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA2. Pirassununga, 2008	133
Tabela 20 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA1. Pirassununga, 2009	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 21 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA2. Pirassununga, 2009	136
Tabela 22 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA3. Pirassununga, 2009	137
Tabela 23 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA4. Pirassununga, 2009	137
Tabela 24 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA5. Pirassununga, 2009	138
Tabela 25 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA1. Pirassununga, 2009.....	138
Tabela 26 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA2. Pirassununga, 2009.....	139
Tabela 27 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA3. Pirassununga, 2009.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma (s)
µl	Microlitro (s)
µCi	Microcurie
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanômetro (s)
Abs	Absorbância
A	Adenina
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência adquirida
APTX	<i>Triton X extracted antigen</i> - Antígeno extraído pelo APTX
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Citosina
con-A	Concanavalina A
CO ₂	Dióxido de carbono
cDNA	DNA complementar
DAP	Ácido diaminopimélico
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	<i>Deoxynucleoside triphosphates</i> - Deoxinucleotídeos trifosfatos
DO	Densidade ótica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> - Ensaio Imunienzimático
FD	Fator de diluição
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G	Guanina
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> - Tecido linfóide associado ao intestino
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LTB	Lavado traqueobrônquico
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> – Complexo de histocompatibilidade principal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NO	Oxido Nítrico
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i> – Solução salina tamponada com fosfastos
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
<i>R. equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
rpm	Rotações por minuto
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> - Acido Ribonucléico
RNA _m	<i>Messenger ribonucleic acid</i> – acido ribonucléico mensageiro
rVapA	VapA recombinante
T	Tiamina
Th	<i>T helper</i> – Linfócito T auxiliar
TLR	<i>Toll like receptors</i> – receptores do tipo toll
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> - Fator de necrose tumoral
U	Unidade (s)
UFC	Unidades formadoras de colônias
ULTB	Ureia de LTB
US	Ureia do soro
Vap	<i>Virulence associated protein</i> - Proteína associada a virulência

Obs: Devido ao uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia em inglês.

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	porcentagem
γ	gama
β	beta
λ	lambda
=	igual
X	vezes
<	menor
Δ	delta
-	negativo (s)

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1	<i>Rhodococcus equi</i> – etiologia e epidemiologia	30
2.2	Manifestações clínica	32
2.3	Determinantes de virulência	34
2.4	Biologia Celular	36
2.5	Imunidade frente ao <i>Rhodococcus equi</i>	37
2.5.1	Imunidade humoral	37
2.5.2	Imunidade Celular	38
2.6	<i>Rhodococcus equi</i> e vacinas	41
2.7	Vacinas de DNA	43
2.8	<i>Salmonella</i> e vacinas	44
2.9	Vacinação em neonatos	46
3	OBJETIVOS	48
3.1	Objetivo Geral	48
3.2	Objetivos Específicos	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Animais	49
4.2	Linhagem vacinal	49
4.3	Preparo de células de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium χ 3987 contendo os plasmídios pYA3137 ou pYA3137vapA	50
4.4	Protocolo de imunização	51
4.4.1	Primeira etapa experimental	51
4.4.2	Segunda etapa experimental	51

4.5	Cultivo de suspensões de <i>R. equi</i> para a infecção experimental	51
4.6	Infecção experimental com <i>R. equi</i> virulento	52
4.6.1	Primeira etapa experimental	52
4.6.2	Segunda etapa experimental	52
4.7	Acompanhamento clínico	53
4.8	Coleta de sangue	54
4.9	Hemograma	54
4.10	Dosagem de imunoglobulinas séricas específicas a antígenos do <i>R. equi</i>	55
4.11	Separação das células mononucleares do sangue para ensaio de proliferação de linfócitos	55
4.12	Ensaio de proliferação de linfócitos sanguíneos frente ao APTX	56
4.13	Dosagem de citocinas por PCR em tempo real de células do sangue periférico	56
4.14	Coleta de lavado traqueobrônquico	58
4.15	Dosagem de citocinas por PCR em tempo real de células do LTB	59
4.16	Dosagem de IgA no LTB	59
4.17	Dosagem de ureia no LTB e no soro	59
4.18	Avaliação da presença de <i>R. equi</i> no fluido pulmonar	60
4.19	Avaliação do perfil celular de LTB	61
4.20	Análise estatística dos resultados	61
4.21	Delineamento Experimental	62
5	RESULTADOS	63
5.1	Primeira etapa experimental	63

5.1.1	Acompanhamento clínico	63
5.1.2	Alterações hematológicas	66
5.1.3	Dosagem de imunoglobulinas séricas	66
5.1.4	Proliferação de linfócitos sanguíneos frente ao APTX	69
5.1.5	Expressão de citocinas por células do sangue periférico analisadas por PCR em tempo real	70
5.1.6	Avaliação da presença de <i>R. equi</i> no fluido pulmonar	73
5.1.7	Avaliação do perfil celular do LTB	74
5.2	Segunda etapa experimental	76
5.2.1	Acompanhamento clínico	76
5.2.2	Alterações hematológicas	80
5.2.3	Dosagem de imunoglobulinas séricas	81
5.2.4	Proliferação de linfócitos sanguíneos frente ao APTX	83
5.2.5	Expressão de citocinas por células do sangue periférico analisadas por PCR em tempo real	85
5.2.6	Expressão de citocinas por células do LTB analisadas por PCR em tempo real	88
5.2.7	Dosagem de IgA no LTB	91
5.2.8	Avaliação da presença de <i>R. equi</i> no fluido pulmonar	92
5.2.9	Avaliação do perfil celular do LTB	94
6	DISCUSSÃO	97
7	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICES.....	127

1 INTRODUÇÃO

Doenças respiratórias infecciosas constituem uma das maiores causas de morte e perdas econômicas na indústria eqüina. Entre elas pode-se destacar a rodococose, moléstia causada por infecção oportunista pela bactéria *Rhodococcus equi* (*R. equi*).

Rhodococcus equi foi inicialmente descrito como um patógeno animal, por causar pneumonia grave e/ou enterite, muitas vezes fatal, em potros de um a seis meses de idade (WILSON, 1997). Hoje ele é também reconhecido como um patógeno oportunista em humanos, causando pneumonia cavitária muito semelhante à de eqüinos (VOTAVA; SKALKA; TEJKALOVA, 1997), associada a AIDS em pacientes infectados com o vírus HIV. Dentre as características da bactéria, destacam-se a versatilidade e a ampla capacidade de adaptação a ambientes tão diversos como o solo e o organismo de mamíferos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2009). Similarmente a outros membros patogênicos do grupo dos actinomicetos nocardioformes, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Nocardia asteroides*, *R. equi* é um microorganismo intracelular que estabelece um nicho específico no interior da célula do hospedeiro e sobrevive através de um desvio da via normal de maturação do fagossomo (VON BARGEN; HAAS 2009).

A infecção por *R. equi* representa grandes prejuízos econômicos para criatórios onde a doença está presente de forma endêmica, devido a alta mortalidade e a dificuldade de sucesso no tratamento, que além de ter alto custo, pode não ser eficaz, devido ao aparecimento de amostras de *R. equi* resistentes aos antibióticos convencionais (GIGUERE et al., 2010). Além disso, os potros que sobrevivem a rodococose poderão ter seu desempenho atlético comprometido e a reputação de tais criatórios com a forma endêmica da doença poderá ser afetada (LAVOIE; FISET; LAVERTY, 1994; AINSWORTH et al., 1997).

Não existe no mercado vacina que seja comprovadamente segura e eficaz contra a rodococose e o único método de prevenção consiste em alterações no manejo da propriedade e na administração de plasma hiperimune, que além de não ser confirmadamente efetivo, representa alto custo para a propriedade (GIGUERE et al., 2002; CASTON et al., 2006). Diversas estratégias vacinais já foram testadas, usando *R. equi* avirulento ou bactérias mortas (LOPEZ et al., 2003; CAUCHARD et al., 2004; TAOUI et al.,

Introdução

2004; HAGHIGHI; PRESCOTT, 2005), porém todas falharam na indução de proteção. Muitos trabalhos relatam a importância de VapA, uma proteína de superfície, como imunógeno, pois acredita-se que a ativação de uma resposta específica para essa proteína possa induzir proteção ou amenizar a doença. Segundo Muscatello et al. (2007) somente uma vacina que mimetize o máximo possível o curso natural da infecção levará ao desenvolvimento de uma resposta protetora eficiente.

Cepas atenuadas de *Salmonella* foram primeiramente desenvolvidas para prevenir a doença causada por infecções por essa bactéria em homens e animais (GERMANIER; FÜRER, 1971), posteriormente ficou constatado que funcionam como ótimas carreadoras de antígenos heterólogos (CHATFIELD et al., 1992). Linhagens vacinais de *Salmonella* oferecem diversas vantagens em relação a vacinas tradicionais, incluindo, estimulação intensa de resposta imune de mucosa e sistêmica, não necessitam de injeções para serem utilizadas (oral ou nasal), são seguras para o hospedeiro (HOISETH; STOCKER, 1981) e possuem um custo de produção relativamente baixo (BRANGER et al., 2009).

Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de uma vacina contra *R. equi*, e dispondo de uma cepa de *Salmonella enterica* Typhimurium atenuada, o Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, investiu esforços na produção de uma linhagem vacinal contra *R. equi*. Para tanto, o gene *vapA*, foi extraído de *R. equi*, amplificado por PCR e clonado no plasmídio pYA3137, pertencente ao sistema letal balanceado *asd*, onde o gene *vapA* foi expresso a partir do promotor constitutivo *trc*. Em seguida, os plasmídios pYA3137trcvapA e pYA3137trc foram eletroporados em *S. Typhimurium* χ 4217 Δ cya Δ crp Δ asd e transferidos para *S. Typhimurium* χ 3987 por transdução. Assim, obteve-se uma linhagem atenuada de *S. Typhimurium* χ 3987 Δ cya Δ crp Δ asd, contendo o plasmídio pYA3137trcvapA, capaz de expressar a proteína VapA. Ao imunizarem camundongos BALB/c, por via oral, com essa linhagem bacteriana, verificaram que houve colonização e persistência da *Salmonella* nos órgãos linfóides. Frente ao desafio com *R. equi*, houve *clearance* eficiente dessa bactéria no pulmão, fígado e baço, significativamente superior ao verificado em camundongos não imunizados, ou imunizados com *Salmonella* não transformada, demonstrando que a imunização de camundongos com tal linhagem vacinal conferiu proteção contra a rodococose (OLIVEIRA et al., 2007a), e que essa proteção foi direcionada por uma resposta imunitária de perfil Th1 (OLIVEIRA et al., 2010).

Introdução

Frente a tais resultados nos propusemos a imunizar potros com tal linhagem vacinal e após infecção experimental avaliar as respostas clínica e imunitária específicas para o *R. equi*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Rhodococcus equi é a espécie de *Rhodococcus* com o maior potencial patogênico para animais, incluindo humanos (PRESCOTT, 1991). Foi primeiramente descrito em 1923 por Magnusson como *Corynebacterium equi*, a partir de isolado pulmonar de um potro com pneumonia piogranulomatosa (MAGNUSSON, 1923). A classificação do *R. equi* como um membro do gênero *Rhodococcus* foi assunto em discussão (GURTLER; MAYALL; SEVIOUR, 2004), porém a análise do genoma recentemente seqüenciado confirma essa afiliação taxonômica pela grande similaridade com o genoma do *Rhodococcus* sp. RHA1 (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2009).

2.1 *Rhodococcus equi* – etiologia e epidemiologia

R. equi é um microorganismo intracelular facultativo, coco-bacilo difteróide encapsulado, aeróbico, gram-positivo, e parcialmente ácido resistente. É uma bactéria catalase positiva, parcialmente uréase positiva, oxidase negativa e a sua temperatura ótima de crescimento está entre 30°C e 37°C. Suas colônias podem ser observadas após 48 horas de cultivo e são caracteristicamente mucóides e irregulares, apresentando coloração róseo-salmão (PRESCOTT, 1991). Pode ser isolado do aspirado traqueal de potros (HIGUCHI et al., 1998), das fezes de cavalos (TAKAI et al., 1995) e também do pulmão de potros que morrem de pneumonia causada pela bactéria (MADARAME et al., 1996).

R. equi é um habitante do solo e aparentemente um microorganismo saprófita do intestino de herbívoros. Pode sobreviver a condições ambientais extremas como baixo pH e estresse oxidativo (BENOIT et al., 2002). Ele multiplica-se facilmente nos solos que recebem esterco de herbívoros o que explica o fato deste patógeno ser mais abundante nos lugares onde o homem cria cavalos por muitos anos (WILSON, 1997).

Revisão de Literatura

A rodococose é um problema mundial, e no Brasil é assinalada como uma das doenças mais severas na criação de potros (LANGONI et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2007b). A distribuição do *R. equi* é muito variável, podendo estar presente de forma endêmica em algumas fazendas, ocorrer esporadicamente, ou mesmo nunca aparecer em outras. Isto pode ser explicado pelas diferenças na densidade de potros, manejo da fazenda e fatores ambientais como temperatura, empoeiramento e pH do solo (MUSCATELLO et al., 2007). A hipótese que a quantidade de *R. equi* virulento no solo seria fator determinante da doença (MEIJER; PRESCOTT, 2004) ficou desacreditada após estudo realizado por Cohen et al. (2008) que demonstrou que a proporção de cepas virulentas no ambiente não é indicador da prevalência da rodococose. Similarmente, a proporção relativa de *R. equi* virulento nas fezes das éguas não é indicativo de desenvolvimento de rodococose em seus potros (GRIMM et al., 2007).

Potros infectados são a principal fonte de contaminação em fazendas com história da doença, pois espalham quantidades muito superior de *R. equi* virulento em suas fezes (TAKAI, 1997), do que cavalos adultos. A concentração de bactérias nas fezes dos potros declina a partir da sétima semana de vida, pelo desenvolvimento de imunidade local ou pela mudança do ambiente intestinal de aeróbico para anaeróbico (TAKAI; IIMORI; TSUBAKI, 1986). A infecção ocorre principalmente pela inalação de partículas de poeira contaminadas com a bactéria (MUSCATELLO et al., 2007), apesar de o trato alimentar ou a pele lesada poder servir de porta de entrada (VOTAVA; SKALKA; TEJKALOVA, 1997) e segundo Flamino et al. (2009), os potros já são expostos a ela imediatamente após o nascimento. A maioria dos casos diagnosticados em potros ocorre durante a seca em verões quentes, pois durante essa época do ano ocorre um aumento do empoeiramento, tornando os animais mais expostos à contaminação por partículas de poeira (MEIJER; PRESCOTT, 2004). A transmissão da bactéria de potro para potro ainda não foi documentada a despeito de a bactéria poder ser encontrada no ar expirado por potros doentes (MUSCATELLO; GILKERSON; BROWNING, 2009).

Os prejuízos econômicos advindos de infecções por *R. equi* constituem o principal motivador de estudos destinados ao controle da doença. Segundo Varga et al. (1997) as medidas mais importantes para o controle da pneumonia em potros causada por *R. equi* são: manejo adequado dos animais, higiene rigorosa, diagnóstico precoce da infecção e

---

Revisão de Literatura

isolamento e tratamento dos potros doentes com antibióticos específicos. Para prevenir a pneumonia por *R. equi* alguns autores preconizam a administração de soro ou plasma hiperimune em potros (MADIGAN; HIETALA; MULLER, 1991; BECÚ; POLLEDO; GASKIN, 1997), além da imunização ativa de éguas (MADIGAN; HIETALA; MULLER, 1991) ou de potros (PRESCOTT et al., 1997) com diferentes vacinas, ainda experimentais. Alguns autores têm relatado uma redução na morbidade e na mortalidade após a administração do plasma hiperimune (MADIGAN; HIETALA; MULLER, 1991; HIGUCHI et al., 1999; CASTON et al., 2006) em contraste, outros estudos não têm demonstrado sucesso na prevenção do desenvolvimento da rodococose após a administração do plasma hiperimune (GIGUERE et al., 2002; PERKINS et al., 2002). Segundo Dawson et al. (2010) a efetividade do plasma hiperimune pode ser afetada pela dose, momento da administração, competência do sistema imune, condições de manejo e pela quantidade de bactéria virulenta no ambiente.

Recentemente diferentes estratégias profiláticas vêm sendo testadas (CHAFFIN; COHEN; MARTENS, 2008; CHAFFIN et al., 2008; VENNER et al., 2009). Chaffin; Cohen e Martens (2008) descreveram a eficiência da administração oral de azitromicina nas primeiras duas semanas pós-parto em reduzir em 85% a incidência da rodococose em fazendas endêmicas dos Estados Unidos. Em contraste, estudo semelhante realizado na Alemanha, não demonstrou diminuição da incidência da pneumonia (VENNER et al., 2009).

2.2 Manifestações clínicas

Potros de 1 a 6 meses de idade são freqüentemente infectados por *R. equi* e essa é a maior causa de abscessos pulmonares nesses animais (LAVOIE; FISET; LAVERTY, 1994). A manifestação clássica da doença é uma infecção inaparente associada a leucocitose por neutrofilia, hiperfibrinogenemia com ou sem alterações respiratórias (MUSCATELLO et al., 2007). A doença na sua forma severa caracteriza-se pela massiva abscedação do pulmão com presença de febre e neutrofilia podendo ou não estar associada a tosse e descarga nasal (YAGER, 1987) e com a progressão do quadro os animais tendem a apresentar anorexia, decúbito, respiração abdominal e cianose, que se não imediatamente controlados

---

Revisão de Literatura

culminam para o óbito. A auscultação pulmonar dos animais doentes pode variar consideravelmente, sibilos ou estertores expiratórios podem ser audíveis e são mais comumente localizados cranioventralmente. Os sons pulmonares podem estar diminuídos em áreas de consolidação severa, formação extensiva de abscesso ou efusão pleural (GIGUERE; PRESCOTT, 1997).

O aparecimento das manifestações clínicas está relacionado ao destino que a bactéria terá após ser inalada. O que freqüentemente ocorre nos potros suscetíveis, é a fagocitose da bactéria pelos macrófagos alveolares, sem a sua destruição (ZINK et al., 1987). Nos estágios iniciais da infecção os alvéolos ficam ocupados por neutrófilos, macrófagos e células gigantes muitas vezes contendo a bactéria (JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983). Com o progresso da doença o parênquima pulmonar vai se tornando necrótico e os linfonodos bronquiais e mesentéricos podem ser afetados (YAGER, 1987; TAKAI et al., 1994). As lesões piogranulomatosas que aparecem no pulmão refletem a capacidade de *R. equi* de sobreviver no interior de macrófagos, à semelhança de *Mycobacterium tuberculosis* (MEIJER; PRESCOTT, 2004).

Diarréia severa acompanhada de tiflocolite ulcerativa (MEIJER; PRESCOTT, 2004) pode ser observada principalmente em animais que ingeriram fezes contendo grandes quantidades de bactéria (VON BARGEN; HAAS, 2009). A deposição de imunocomplexos nas membranas causa polisinovite em muitos animais (GIGUERE, 2000; RIBEIRO et al., 2002) e contribui para o desenvolvimento de uveíte (BEECH; SWEENEY, 1991).

Como manifestações mais raras encontram-se panoftalmite, nefrite, abscedação hepática e renal, artrite purulenta (TAKAI et al., 1994), linfangites ulcerativas, osteomielite, serosite, abscedação intravertebral (ZINK; YAGER; SMART, 1986) e ulceração cutânea (SMITH; JANG, 1980). A rodococose pode estar ocasionalmente relacionada à abortamentos e placentites (PATTERSON-KANE; DONAHUE; HARRISON, 2002).

Cavalos adultos são raramente infectados, já que conseguem montar uma resposta protetora contra a bactéria. Recentemente ficou demonstrado que a infecção em cavalos adultos em treinamento está relacionada com um aumento da exposição à bactéria em determinadas épocas do ano. Em uma pequena porcentagem desses animais pode-se detectar a presença de abscessos no pulmão associada a febre e inapetência. A redução da

---

Revisão de Literatura

exposição à bactéria pode ser suficiente para resolver o problema, porém alguns animais podem necessitar de antibioticoterapia (FOGARTY; GRATH; BUCKLEY 2008).

Em humanos imunodeficientes a maioria das infecções também culmina em pneumonia e abscesso pulmonar (WEINSTOCK; BROWN, 2002), mas muitas vezes a bactéria pode atingir outros órgãos devido à bacteremia (VON BARGEN; HAAS, 2009).

2.3 Determinantes de virulência

Durante muito tempo a virulência do *R. equi*, foi relacionada a três fatores: a) cápsula polissacarídica (por inibir a fagocitose ou sua futura lise no interior de macrófagos), b) enzimas fosfolipase C e colesterol oxidase (ação membranolítica combinada – chamadas de “fator equi”) e c) ácidos micólicos da parede celular (PRESCOTT et al., 1982), porém hoje, novas descobertas alteraram essa visão. A cápsula polissacarídica tem pouca relevância para a virulência e parece ser crucial apenas para a sobrevivência no ambiente (SYDOR et al., 2007; Von BARGEN; HAAS, 2009). Já é de conhecimento que cepas avirulentas da bactéria também secretam as enzimas chamadas “fator equi”, e a definitiva recusa desses fatores como determinantes de virulência, foi comprovada a partir da análise de camundongos sem o gene para a enzima colesterol oxidase (PEI et al., 2006).

A partir da década de 90 foi possível começar a entender melhor os mecanismos de virulência, quando Takai et al. (1991a) observaram que o soro de potros infectados continha invariavelmente altos níveis de anticorpos contra um antígeno de aproximadamente 15-17 kDa, correspondente a uma lipoproteína expressa na superfície celular, que foi posteriormente denominada VapA (TAN et al., 1995). Uma segunda grande descoberta foi a confirmação de que o gene *vapA* está localizado em um plasmídio endógeno do *R. equi* de aproximadamente 80 a 85 kb (TAKAI et al., 1991b; TKACHUK-SAAD; PRESCOTT, 1991). Múltiplas cópias desse plasmídio podem estar presentes na bactéria (RODRIGUEZ-LAZARO et al., 2006), porém ele é perdido depois de repetidas passagens em meio de cultura a 38°C (TAKAI et al., 1991b).

Revisão de Literatura

A análise dos plasmídios de virulência da cepa ATCC33701 de *R. equi*, denotou a presença de uma ilha de patogenicidade contendo nove genes protéicos associados à virulência, incluindo *vapA*. Os *vap* genes foram denominados *vapA*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapG*, *vapH*, *vapI* e pseudo-*vapE* (TAKAI et al., 2000; RUSSELL et al., 2004). Estudos demonstraram que cepas da bactéria que não contém esse plasmídio são incapazes de sobreviver e replicar no interior de macrófagos, sendo avirulentas para potros e camundongos (HONDALUS; MOSSER, 1994; GIGUÈRE et al., 1999; JAIN; BLOOM; HONDALUS, 2003) e que apenas os genes da ilha de patogenicidade são diferencialmente transcritos, quando dentro dos macrófagos eqüinos (MEIJER; PRESCOTT, 2004). Takai et al. (1996) estudando a expressão dos diferentes genes *vap* demonstraram que a máxima expressão de *vapA* ocorre à temperatura de 37°C e pH 6,5 e segundo Benoit et al. (2002) a expressão desse gene é muito aumentada em condições de estresse oxidativo, pela exposição da bactéria a H₂O₂. Todas essas condições são encontradas no interior do fagossomo (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2009), e para Ren e Prescott (2003) o aumento de temperatura é o fator de maior impacto na indução da expressão do gene *vapA*.

Cepas de *R. equi* isoladas de humanos e suínos freqüentemente possuem uma proteína de superfície muito semelhante a VapA, denominada VapB (BYRNE et al., 2001). Cepas contendo VapB possuem baixa virulência para potros, visto que Takai et al. (2000) verificaram que potros inoculados com 10⁶ bactérias expressando VapB, não manifestaram sinais clínicos de doença. No entanto, potros que receberam 10⁶ bactérias expressando VapA (15-17kDa) apresentaram graves manifestações clínicas. Similarmente, Jain; Bloom e Hondalus (2003) demonstraram reversão de virulência após inserção do gene *vapA* no plasmídio de virulência, mas não após a inserção dos genes *vapC*, *D*, *E* ou *F*, evidenciando, assim, o papel da proteína VapA na virulência do *R. equi*.

Ribeiro et al. (2005) em estudo epidemiológico feito no Brasil, encontraram plasmídio de virulência e gene *vapA* em 100% das amostras avaliadas, provenientes de animais acometidos por *R. equi*, reforçando a idéia de que a proteína VapA desempenha importante papel na virulência da bactéria encontrada no país.

Outros fatores de virulência ligados ao cromossomo vêm sendo estudados, principalmente genes relacionados a aquisição de nutrientes (MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2005; WALL et al., 2005), à resistência ao estresse oxidativo (PEI et al., 2007) e a genes

---

Revisão de Literatura

participantes de sistemas regulatórios magnésio-dependente (REN; PRESCOTT, 2004), sistema envolvido na transcrição de genes do plasmídeo de virulência (REN; PRESCOTT, 2003).

2.4 Biologia Celular

Está estabelecido que a infectividade do *R. equi* é exclusivamente limitada a células da linhagem monócito-macrófago (MEIJER; PRESCOTT, 2004). Ainda que o parasitismo intracelular seja facultativo e a bactéria seja suscetível a morte mediada por neutrófilos, ela resiste à defesa macrofágica inata e estabelece residência no meio intracelular do fagócito (HONDALUS, 1997). Sabe-se que a bactéria inibe a fusão do lisossomo ao fagossomo (SPEERT, 1992), característica relacionada com: (1) interferência na maturação do fagossomo, similarmente ao ocorrido nas infecções por *Mycobacterium* ssp, *Nocardia* asteróides e *Legionella pneumophila* (ARMSTRONG; HART; 1971; DAVIS-SCIBIENSKI; BEAMAN; 1980; HORWITZ, 1983) e (2) manutenção de um pH apenas levemente ácido (6,5), ação semelhante a de *M. tuberculosis* (ARMSTRONG; HART, 1975; CLEMENS; HORWITZ, 1996; TOYOOKA; TAKAI; KIRIKAE, 2005).

Foi anteriormente sugerido que a sobrevivência no interior dos macrófagos seria direcionada pelo modo de entrada do *R. equi* nas células. Se a entrada ocorresse via fagocitose, mediada pela opsonização da bactéria por anticorpos específicos, seria desencadeada uma cascata intracelular que levaria a morte da bactéria (HIETALA; ARDANS, 1987) enquanto a entrada via receptores não Fc alteraria o destino da bactéria. Segundo Garton et al. (2002) a entrada de *R. equi* poderia ocorrer a partir do reconhecimento de lipoarabinomanana pelo receptor de manose, de macrófagos, ou pelo seu reconhecimento por outras lectinas, como ocorre com a lipoarabinomanana do *M. tuberculosis*, que se liga a proteína surfactante A pulmonar humana.

Hoje se sabe que os produtos codificados pelo plasmídeo de virulência contribuem para que *R. equi* sobreviva e se replique no interior dos macrófagos (MEIJER; PRESCOTT, 2004). Segundo Haas et al. (2002), a maturação do fagossomo é mais eficientemente desviada em

---

Revisão de Literatura

amostras que possuem plasmídeo de virulência em comparação a amostras isogênicas que não contenham esse plasmídeo. Em recente trabalho publicado por Von Bargen et al. (2009), ficou pela primeira vez demonstrado que a expressão da proteína VapA é essencial para a prevenção da acidificação do fagossomo, mesmo que não seja necessária para a indução da morte celular por necrose. A proliferação intracelular da bactéria leva a uma morte por necrose dos macrófagos, acompanhada de danos massivos no tecido pulmonar, caracterizado por formações granulomatosas e cavitações (LURMAN et al., 2004).

2.5 Imunidade frente ao *Rhodococcus equi*

A imunidade contra o *R. equi* em potros depende tanto da resposta celular quanto da resposta humoral, mas as bases exatas não foram determinadas.

2.5.1 Imunidade Humoral

Segundo Dawson et al. (2010) o desenvolvimento de uma resposta humoral tanto de mucosa, quanto sistêmica é necessária para a proteção contra a rodococose. IgGa e IgGb são os isotipos mais abundantes no soro e no colostro dos eqüinos (SHEORAN et al., 2000) e uma resposta desses isotipos, específica contra a VapA, foi observada em cavalos adultos sete dias após o desafio experimental (LOPEZ et al., 2002). Porém um estudo mais recente demonstrou que a infecção experimental de cavalos adultos produziu um aumento significativo apenas de IgGb, quando comparado às outras subclasses de IgG e que esse aumento contribuiu para a opsonização da bactéria (JACKES et al., 2007a). Contrastando com esse resultado, Lewis; Wagner e Woof (2008) investigando as funções efetoras das subclasses de IgG eqüina, demonstraram que IgGa e IgGb são os anticorpos mais importantes para a defesa contra patógenos comuns como o *R. equi*, através da estimulação da ativação do complemento e do *burst* respiratório. Em indivíduos não imunes, a ligação de

---

Revisão de Literatura

R. equi a células de mamíferos é dependente do sistema complemento, pois o C3b opsonizante depositado na superfície da bactéria é reconhecido por Mac-1, receptor de complemento de macrófagos (HONDALUS et al., 1993).

Foi demonstrado por Hooper-McGrevy et al. (2001) que a administração passiva de imunoglobulinas purificadas provenientes de cavalos imunizados com VapA, protegeu potros contra o desafio experimental. Resultado semelhante foi obtido por Fernandez; Prescott e Nicholson (1997), que administraram a camundongos IgG anti-VapA de éguas vacinadas com antígeno enriquecido de VapA, e constatou seu efeito protetor. Possivelmente esse efeito protetor está associado à capacidade de IgG anti-VapA de promover um aumento da opsonização do *R. equi* (BECÚ; POLLEDO; GASKIN, 1997; HOOPER-McGREVY et al., 2001). Contraditoriamente, tem sido demonstrado que potros nascidos de mães vacinadas não adquirem proteção contra *R. equi* via colostro. Essa falha pode estar relacionada à qualidade da vacina ou ao isotipo de anticorpo cuja produção foi suscitada pelas vacinas utilizadas experimentalmente (MEIJER; PRESCOTT, 2004). A importância da resposta humoral vem sendo atribuída ao fato de o início do aparecimento dos sintomas coincidir com o declínio dos anticorpos adquiridos passivamente pelo colostro (HOOPER-McGREVY; WILKIE; PRESCOTT, 2005), porém a eficácia da administração de plasma hiperimune de forma profilática é controversa (CASTON et al., 2006).

2.5.2 Imunidade Celular

Devido a natureza intracelular facultativa de *R. equi* os mecanismos de imunidade mediada por células são importantes na resistência contra essa bactéria, e evidências mostram que essa resistência requer tanto mecanismos inatos quanto adaptativos (LIU et al., 2009a). A habilidade das células do sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos, em controlar infecções primárias é claramente reconhecida (TIZARD, 2008), porém inadequada em neonatos quando comparada a cavalos adultos (FLAMINIO et al., 2000). Essa diferença pode ser explicada pela limitação da habilidade de opsonização nesses animais, o que reduz a atividade fagocítica (DEMMER et al., 2001; McTAGGART et al., 2001). Adicionalmente, a

---

Revisão de Literatura

expressão reduzida de IFN- γ em potros jovens, também leva a uma redução da atividade fagocítica, já que essa citocina promove a ativação dos neutrófilos e consequente ativação da via de morte microbiana (DAWSON et al., 2010).

O sistema imune inato reconhece os patógenos via diversos receptores, incluindo os receptores do tipo Toll (TLR) (AMATI et al., 2006). Esses receptores sinalizam a via de ativação de fatores transcricionais que regulam a produção de citocinas e outras moléculas regulatórias (NETEA et al., 2004) necessárias para a resposta inata. Darrah et al. (2004) demonstrou que a interação de VapA com TLR-2 corresponde ao evento chave na ativação de macrófagos por *R. equi* e no desencadeamento de resposta inata à bactéria. Alguns estudos indicam uma deficiente sinalização via TLR por neonatos com conseqüente deficiência na resposta inata (MARODI, 2006). A reduzida expressão de MHC de classe II pelas células apresentadoras de antígenos desses animais também podem contribuir para a suscetibilidade desses animais à rodococose (FLAMINIO et al., 2007; FLAMINIO et al., 2009).

A imunidade mediada por linfócitos T representa um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro, uma vez que essas células orquestram a resposta imune através da produção de citocinas. Linfócitos T CD4⁺ são de tipo Th1 ou Th2, distinção feita com base no padrão de citocinas produzidas. Células Th1 produzem IFN- γ , TNF- β e IL-12 e promovem predominantemente a imunidade mediada por células, enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, promovendo forte resposta de anticorpos e inibição das atividades de macrófagos (MOSMANN; COFFMAN, 1989). O desenvolvimento diferencial dessas duas subpopulações de células parece ser o determinante fisiológico, e mesmo patológico, das respostas imunes. De maneira simplista pode-se dizer que respostas Th1 são responsáveis pela proteção contra parasitas intracelulares, enquanto respostas Th2 estão envolvidas na proteção contra parasitas metazoários e nas doenças alérgicas.

As funções exercidas por citocinas do padrão Th1 são cruciais para a eliminação de patógenos intracelulares, como o *R. equi* (KASUGA-AOKI et al., 1999; MUSCATELLO et al., 2007), pelos macrófagos. A indução de mecanismos antibacterianos nos macrófagos é conhecida como ativação macrofágica e é a principal ação efetora das células Th1 (JANEWAY et al., 2002). A IL-12 liberada por células dendríticas e macrófagos ativados induz a diferenciação de células Th0 em Th1. Já a liberação de INF- γ pelas células Th1 promove a ativação macrofágica (DARRAH et al., 2000). Os macrófagos ativados fundem seus

---

Revisão de Literatura

lisossomas aos fagossomas de forma mais eficaz, expondo bactérias intracelulares a uma variedade de enzimas lisossômicas bactericidas (JANEWAY et al., 2002).

Em camundongos e humanos, subtipos de IgG funcionam como indicador de imunidade celular, refletindo um perfil Th1 ou Th2 de resposta. A associação direta de subtipos de IgG com o perfil de citocinas ainda não foi completamente estabelecido em eqüinos, porém alguns estudos relatam a associação de IgGT com perfil Th2 (HOOPER-McGREVY; WILKIE; PRESCOTT, 2003). Estudos recentes indicam que a imunidade contra o herpesvírus eqüino tipo 1 em cavalos é caracterizada por uma resposta de INF- γ em detrimento a uma resposta de IL-4, e predominância de IgGa (FOOTE et al., 2005; COOMBS et al., 2006; SOBOLL et al., 2006). Em contraste, a proteção contra nematóides intestinais como *Strongylus vulgaris* depende de uma resposta de IL-4 e uma predominância de IgG(T) (SWIDERSKI et al., 1998).

Diversos estudos têm confirmado que a imunidade celular exerce papel central contra *R. equi* e que a ativação de macrófagos por mediadores, principalmente IFN- γ , é essencial para a morte da bactéria. Darrah et al. (2000) demonstraram, em modelo murino, que a morte de *R. equi* por macrófagos depende da produção tanto de óxido nítrico (NO) como de superóxidos (O_2^-). Inibindo a produção de um dos dois compostos, os macrófagos perdem a capacidade de controlar a replicação do *R. equi*. Kanaly; Hines e Palmer (1993) e Kanaly et al. (1996), demonstraram que camundongos BALB/c imunocompetentes e infectados com *R. equi* virulento desenvolveram resposta Th1 com progressivo controle da infecção. Já camundongos que tiveram a resposta Th2 induzida, pelo uso de anticorpos anti-IFN- γ , falharam no controle da infecção (KANALY; HINES; PALMER, 1995).

Ao desafiar cavalos por via intratraqueal, Hines et al. (2001) e Hines et al. (2003) demonstraram que o *clearance* de *R. equi* no lavado-broncoalveolar (BALF), está relacionado a uma intensa resposta linfoproliferativa, tanto de células T CD4+ como de células T CD8+, frente a antígeno solúvel de *R. equi* ou a proteína VapA recombinante, reforçando a conclusão que VapA corresponde a antígeno imunodominante. Além disso, células estimuladas apresentaram um aumento significativo na expressão de IFN- γ , e aumento nos níveis de IgGa e IgGb contra VapA.

Até pouco tempo acreditava-se que potros eram deficientes na habilidade de produzir INF- γ (BREATHNACH et al., 2006) e que a infecção com *R. equi* virulento poderia resultar em imunomodulação ineficiente, direcionando uma resposta Th1 que seria eficaz, para Th2,

---

Revisão de Literatura

deletéria (GIGUERE et al., 1999). Jacks et al. (2007) demonstraram que potros jovens conseguem produzir uma resposta de INF- γ adequada, desde que corretamente estimulados, e afirmaram que a infecção de potros não pode ser completamente atribuída a deficiência generalizada de INF- γ ou a uma inapropriada polarização da resposta imune a um fenótipo Th2. No mesmo estudo o grupo observou que nos potros não estimulados, a produção de INF- γ foi significativamente menor do que nos potros estimulados. Recentemente a produção de INF- γ por potros jovens tem sido relacionada à dose de antígeno que o animal é exposto (DAWSON et al., 2010). Baixas doses direcionam a uma resposta predominantemente Th1, enquanto altas doses promovem uma resposta de padrão Th2 (JACKS; GIGUERE, 2010).

Entre os fatores que podem estar envolvidos na suscetibilidade individual de potros à rodococose destacam-se: exposição do sistema respiratório dos potros a um grande número de *R. equi* (JACKS; GIGUERE, 2010), ineficiência no sistema fagocítico (DEMMER et al., 2001), deficiência da atividade de células T citotóxicas (PATTON et al., 2005); ineficiente produção de citocinas de padrão protetor (FLAMINIO et al., 2007) e atraso na maturação e na ativação de células apresentadoras de antígenos (MÉRANT et al., 2009; PARGASS et al., 2009), assim como observado em neonatos murinos (MUTHUKKUMAR; GOLDSTEIN; STEIN, 2000) e humanos (LANGRISH et al., 2002).

2.6 *Rhodococcus equi* e vacinas

A vacinação constitui a melhor ferramenta de saúde pública para profilaxia de doenças infecciosas (JAIN; MEKALANOS, 2000; MEDINA et al., 1999). O objetivo fundamental das vacinas é promover a imunização prévia do indivíduo, de modo que ele passe a responder de forma rápida e eficiente quando em contato com o agente infeccioso, evitando-se, a ocorrência da infecção e/ou o desenvolvimento da doença. Diferentemente de potros, cavalos adultos imunocompetentes resolvem eficientemente a infecção por *R. equi*. Isto porque foram expostos à bactéria precocemente e já montaram uma resposta imunitária protetora, incluindo células específicas com fenótipo de memória. Efeito semelhante é esperado de uma vacina eficiente.

Revisão de Literatura

A imunização ativa de éguas e a subsequente transferência de imunidade passiva para o potro via colostro, não parece proteger o animal contra o desenvolvimento da rodococose, já que estudos mostram resultados contraditórios (MADIGAN; HIETALA; MULLER, 1991; CAUCHARD et al., 2004). Diante disso, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de uma vacina capaz de estimular uma resposta imune humoral e celular efetiva contra o *R. equi*. As formulações são mais freqüentemente dirigidas para a obtenção de respostas específicas contra a proteína codificada por *vapA*. Cauchard et al. (2004) administram VapaA como imunógeno em éguas prenhas, o que resultou em aumento sérico de IgG e da atividade opsonizante, que foi transferida para seus potros.

Como a resposta imune produzida pela imunização ativa de éguas pode variar consideravelmente (BECÚ; POLLEDO; GASKIN, 1997), assim como ocorre com o plasma hiperimune, os estudos recentes têm se voltado para o desenvolvimento de uma vacina contra rodococose a ser usada diretamente nos potros, encorajados principalmente pelas informações obtidas a partir do projeto genoma do *R. equi* (MUSCATELLO et al., 2007). Esses novos estudos estão se baseando principalmente na tecnologia do DNA recombinante e vêm apresentando resultados variados (HAGHIGHI; PRESCOTT, 2005; VANNIASINKAM; BARTON; HEUZENROEDER, 2003). Segundo Dawson et al. (2010) a opção mais promissora para esse desafio é o uso de vacinas orais vivas. Em trabalho desenvolvido por Hooper-McGrevy; Wilkie e Prescott (2005), potros foram imunizados oralmente aos 2, 7 e 14 dias de vida com cepa virulenta de *R. equi* ativa. Uma semana após a última vacinação, os animais foram desafiados intratraquealmente com *R. equi*. Animais não vacinados apresentaram pneumonia grave, vista na necropsia. Animais imunizados não apresentaram lesões pulmonares no exame pós-mortem. A resposta humoral de animais imunizados e não imunizados mostrou que as proteínas VapA e VapC eram imunodominantes e que apenas nos potros imunizados foram detectados altos níveis de anticorpos específicos para proteínas Vap. A maior preocupação com relação ao uso de vacinas orais vivas é o impacto que ela pode causar no trato gastrointestinal dos potros, bem como no ambiente e a solução para esse problema estaria no uso de vacinas vivas, porém atenuadas (DAWSON et al., 2010).

Outros estudos têm investigado o uso de peptídeos das proteínas associadas à virulência (Vaps) como candidatos a vacinas e os resultados mostram um aumento de

---

Revisão de Literatura

anticorpos específicos após a imunização em camundongos, potros e cavalos adultos (HOOPER-McGREVY; WILKIE; PRESCOTT, 2003; TAOUI et al., 2004; CAUCHARD et al., 2006), porém a efetividade desses peptídeos utilizados em potros não foram demonstrados após infecção experimental.

2.7 Vacinas de DNA

Diversas estratégias são empregadas no desenvolvimento de vacinas. As vacinas de primeira geração, reportadas principalmente no começo do século XX, foram produzidas com microrganismos vivos atenuados, como é o caso da vacina BCG contra a tuberculose, ou microrganismos mortos e inativados, como a vacina contra *Bordetella pertussis*. Na última década, foram aprimoradas novas formas de obtenção, produção, administração e apresentação de antígenos às células do sistema imune. Essas estratégias abriram caminho para inovações, particularmente no contexto de desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre estas, estão as vacinas de subunidade, consideradas de segunda geração, constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais, sintéticas ou mesmo recombinantes (HUBBARD et al., 1992). Mais recentemente surgiram as vacinas gênicas ou de terceira geração, onde os genes ou fragmentos, que codificam antígenos imunodominantes são inseridos em vetores de DNA conhecidos como plasmídeos.

Os plasmídeos possuem seqüências de DNA necessárias para seleção e replicação em bactérias, promotores especiais para transcrição, genes que conferem resistência à antibióticos para seleção das bactérias transformadas e seqüências específicas que permitem a expressão gênica em células eucarióticas ou procarióticas (KULKARNI et al., 2008).

2.8 *Salmonella* e vacinas

O emprego de linhagens bacterianas atenuadas como abordagem vacinal tem sido bastante estudado nos últimos anos, com destaque para *Mycobacterium bovis*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri* e *Listeria monocytogenes* (SHATA et al., 2000; ROLAND et al., 2005, SMOLEN et al., 2010). Os organismos de tais linhagens são bons carreadores de antígenos heterólogos ao sistema imune de mamíferos (CHATFIELD et al., 1992; CHATFIELD et al., 1993; EVEREST et al., 1995) devido a sua capacidade de colonizar o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e invadir órgãos e tecidos mais profundos (fígado e baço), mimetizando a infecção natural (BOYLE et al., 2007) e induzindo imunidade humoral (mucosa e sistêmica) e celular (ROLAND et al., 2005; BOYLE et al., 2007), sem lesões significativas no hospedeiro (CHATFIELD et al., 1992; CÁRDENAS; DASGUPTA; CLEMENTS, 1994; GUILLOBEL et al., 2000). Além disso, são de obtenção relativamente simples, tem baixo custo de produção e utilizáveis em vacinações de larga escala (WANG et al., 2009).

Desde a década de 80, linhagens de *S. enterica* geneticamente modificadas, que possuem mutações definidas estáveis, têm sido testadas como vacinas orais e nasais experimentais em várias espécies animais (CHATFIELD et al., 1992; NARDELLI-HAEFLIGER et al., 2001; MIELCAREK; ALONSO; LOCHT, 2001; KULKARNI et al., 2009). Geralmente, a clonagem e expressão de antígenos heterólogos em *S. enterica* são alcançadas através da utilização de plasmídios carregando genes de resistência a antibióticos. No entanto, alguns estudos demonstraram que, na ausência de pressão seletiva, tais plasmídios são instáveis e, portanto, são perdidos após poucos ciclos de replicação ou até mesmo durante o cultivo *in vitro* (CÁRDENAS; CLEMENTS, 1992; KULKARNI et al., 2008). A expressão não regulada de altos níveis de proteínas heterólogas na célula bacteriana, a partir de plasmídios com múltiplas cópias, freqüentemente resulta na rápida perda dos mesmos e de sua expressão (CHATFIELD et al., 1992). As eventuais perdas do

---

Revisão de Literatura

plasmídio e da capacidade de sintetizar o antígeno heterólogo, constituem causas de falha ou de baixa indução de imunidade contra o antígeno em questão (KULKARNI et al., 2008).

Para resolver tais problemas de instabilidade, são empregadas estratégias como a construção de sistemas letais balanceados. Nesses sistemas, a deleção de um gene essencial à sobrevivência bacteriana, é complementada pela introdução de um plasmídio contendo o gene selvagem, denominado gene codificador da proteína heteróloga. O exemplo mais conhecido é representado pelo sistema Asd (GALÁN; NAKAYAMA; CURTISS, 1990). A deleção do gene *asd*, no cromossomo bacteriano, acarreta auxotrofia para o ácido diaminopimélico (DAP), um aminoácido importante na constituição da parede celular de bactérias gram-negativas. Na ausência de DAP, mutantes de *S. enterica* auxotróficos para esse D-aminoácido rompem-se, após poucos ciclos de replicação. Assim sendo, os genes heterólogos são clonados em plasmídios *asd* positivos e estes, utilizados para transformar células Δasd de *Salmonella*. Animais imunizados com tais linhagens recombinantes são colonizados somente por bactérias contendo o plasmídio e, portanto, expressando o antígeno heterólogo (BRANGER et al., 2009).

Linhagens atenuadas de *Salmonella* são ótimas candidatas a vacinas orais, via pela qual apresenta muitas vantagens de aplicação em relação a outras (LIAO et al., 2007; LI et al., 2008; WANG et al., 2009), e que vem sendo constante foco de estudo (SMOLEN et al., 2010). Após administração oral, linhagens de *S. enterica* aderem e invadem células da mucosa intestinal, preferencialmente células M (JONES; GHORI; FALKOW, 1994), e atingem os sítios linfóides das placas de Peyer (PP) e/ou GALT (CARTER; COLLINS, 1974; HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2000). Após a invasão, *S. enterica* replica-se e persiste nas PP e GALT, servindo como fonte de antígenos nesses locais de indução de resposta imune (GEBERT, 1997; JEPSON; CLARCK, 2001). A bactéria freqüentemente reside também em macrófagos (ECKMANN; KAGNOFF, 2001) e em vários órgãos como baço, fígado e linfonodos regionais, induzindo, portanto, resposta imune sistêmica (HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2000).

2.9 Vacinação em neonatos

As infecções endêmicas, como a rodococose, acometem preferencialmente animais jovens, quando o sistema imune é funcionalmente imaturo e os anticorpos maternos não promovem boa proteção, mas podem bloquear resposta imune efetora. Vacinas podem levar a superação desse problema trazendo grandes benefícios aos animais (MOREIM; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002).

O mecanismo que regula a resposta imunitária neonatal não é completamente entendido. O estudo da resposta imune mediada por célula em neonatos humanos e murinos, normalmente revela uma pronunciada tendência no desenvolvimento de uma resposta de padrão Th2 (ADKINS, 2000), fato justificado pela secreção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 na interface materno fetal, que promovem um efeito supressivo na secreção de citocinas do padrão Th1 (WEGMANN et al., 1993; RAGHUPATHY, 1997). Além disso, Rukavina e Podack, (2000) afirmam que fatores placentais como a progesterona promovem uma diminuição na expressão IL-12 e aumento na expressão de IL-10, contribuindo para um padrão Th2 de resposta e para uma maior suscetibilidade do neonato a infecção por patógenos intracelulares (DELESPESE et al., 1998; KORVARIK; SIEGRIST, 1998). Segundo Velilla; Rugeles e Chougnet (2006), um imaturo sistema de apresentação de antígenos também pode estar envolvido na pobre resposta imunológica neonatal. Porém em certas circunstâncias neonatos conseguem montar uma resposta Th1 semelhante a de animais adultos (MARCHANT; GOLDMAN, 2005; JACKS et al., 2007; SIEGRIST, 2007) isso sugere que quando corretamente estimulados, neonatos são capazes de montar uma resposta celular específica (LIU et al. 2009b; SMOLEN et al., 2010).

O potencial das vacinas de DNA em estimular uma resposta humoral e celular com componentes do padrão Th1, tem incentivado a realização de diversos estudos utilizando modelos de doenças infecciosas em neonatos (BOT; BONA, 2002). Não é fácil prever o resultado da exposição de recém nascidos a pequenas quantidades de antígeno por um

---

Revisão de Literatura

intervalo prolongado, porém vetores de DNA expressando antígeno microbiano utilizados em protocolos de imunização de camundongos (MANICKAN; YU; ROUSE, 1997), de primatas não humanos (BAGAZZARI et al., 1997; PRINCE; WHALEN; BROTMAN, 1997) e de ovinos (DEN HURK et al., 1999), têm promovido uma resposta imune eficaz, humoral e celular. Bot et al. (1996) ao imunizarem camundongos recém nascidos com um plasmídeo expressando uma núcleo proteína do vírus da influenza, obtiveram ótimos resultados, manifestos por intensa resposta linfocítica citotóxica e *clearance* eficaz do vírus.

Mais recentemente Capozzo et al. (2004) imunizaram camundongos neonatos com uma linhagem vacinal de *Salmonella enterica* encontraram potente resposta imune de mucosa e sistêmica, com intensa proliferação de linfócitos T, produção de anticorpos e secreção de IFN- γ . Segundo os autores, a colonização e persistência do organismo vacinal na mucosa nasal foram determinantes para o desenvolvimento da resposta imune, pois macrófagos e células dendríticas foram recrutadas para o tecido de 10 a 16 horas após a vacinação, e uma grande parte dessas células continha antígenos de *Salmonella* intracelularmente, e atuaram como apresentadoras de antígeno, induzindo a proliferação *in vitro* de células T específicas para *Salmonella*. Concluíram que a preparação vacinal com *Salmonella enterica* foi muito eficiente na indução de proteção local e sistêmica podendo ser aplicada na imunização de neonatos, mesmo na presença de anticorpos maternos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta clínica e imunitária de potros imunizados com *S. Typhimurium* χ 3987 pYA3137vapA, antes e depois do desafio com cepa virulenta de *R. equi*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a segurança da administração da linhagem vacinal em potros neonatos.
- Avaliar clinicamente os potros imunizados.
- Avaliar a resposta humoral.
- Avaliar a resposta celular.
- Avaliar a sobrevivência de *R. equi* no pulmão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

O estudo foi realizado em duas etapas experimentais. Para realização da primeira etapa experimental foram utilizadas 11 éguas prenhas da raça Puro Sangue Inglês e para a segunda fase 10 éguas prenhas da mesma raça. As éguas foram mantidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em Pirassununga-SP.

Durante o experimento os animais foram mantidos em piquetes de tifton, sob condições naturais de luz, temperatura, umidade e água *ad libitum*. Além da forrageira as éguas recebiam ração balanceada e feno de gramínea *coast-cross* duas vezes ao dia.

4.2 Linhagem vacinal

Por motivo de simplificação para descrever *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovariedade Typhimurium será utilizada a nomenclatura *S. enterica* Typhimurium. A linhagem vacinal de *S. enterica* Typhimurium atenuada foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Marcelo Brochi (FMRP-USP). Para a realização dos ensaios a *S. enterica* Typhimurium χ 3987 foi previamente transformada com os plasmídios pYA3137vapA ou pYA3137 (Figura 1), conforme descrito por Oliveira et al. (2007a).

Figura 1 - Esquema representativo da construção da linhagem vacinal utilizada

4.3 Preparo da linhagem vacinal de *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 contendo os plasmídios *pYA3137* ou *pYA3137vapA*

O cultivo e preparo das células recombinantes foram realizados conforme descrito por Oliveira et al. (2007a).

Pelo fato das amostras vacinais serem preparadas em Ribeirão Preto e o protocolo experimental ser executado em Pirassununga, percebeu-se a necessidade de liofilização das suspensões bacterianas para otimizar seu transporte e conservação. Foram realizados testes de viabilidade de amostras liofilizadas na ausência e/ou presença de agentes estabilizadores. Os estabilizadores utilizados nos ensaios foram: lactose, glicose e sacarose. Os resultados proporcionados levaram à opção pelo uso de lactose a 3,5%. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em PBS suplementado com 10% de leite em pó, imediatamente antes da

---

Material e Métodos

imunização. Ensaios em laboratório demonstraram a manutenção da viabilidade celular por até um mês após a liofilização.

4.4 Protocolo de imunização

4.4.1 Primeira etapa experimental

Os animais foram imunizados pela via intranasal (através de injeção na mucosa nasal), com 500 µL das suspensões bacterianas (aproximadamente $2,5 \times 10^9$ UFC) em até 12 horas após o nascimento. Foi feito um reforço após 14 dias em todos os animais.

4.4.2 Segunda etapa experimental

Os animais foram imunizados pela via oral, com 500 µL das suspensões bacterianas (aproximadamente $2,5 \times 10^9$ UFC) em até 12 horas após o nascimento. Foi feito um reforço após 14 dias em todos os animais.

4.5 Cultivo de suspensões de *R. equi* para a infecção experimental

A cepa virulenta de *R. equi* (ATCC33701) utilizada nesse estudo foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Shinji Takai (Universidade de Kitasato-Japão) .

A cultura bacteriana de *R. equi* foi inoculada em 250 mL de caldo BHI e mantida por 66 horas a 37°C sob agitação a 100 rpm. Foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm,

---

Material e Métodos

até atingir leitura igual a 1.3, quando o material foi centrifugado a 2000xg a 4°C e lavado uma vez com 100 mL de PBS. O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de PBS estéril e a suspensão de *R. equi* diluída seriadamente (10^{-1} a 10^{-9}) no mesmo diluente. Posteriormente, 100 µL das diluições entre 10^{-7} a 10^{-9} foram semeadas em placas de petri (ágar BHI). Após 48 horas de incubação a 37°C, foi feita a contagem das colônias que cresceram no ágar, como forma de estimar o número de bactérias na amostra original a ser inoculada em potros.

4.6 Infecção experimental com *R. equi* virulento

O experimento foi feito com o intuito de avaliar as diferentes respostas nos animais imunizados ou não com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 contendo o plasmídeo pYA3137vapA.

4.6.1 Primeira etapa experimental

Os animais foram infectados com aproximadamente 2×10^7 UFC da cepa virulenta de *R. equi*, através de inoculação pela via intranasal no 28º dia de vida.

4.6.2 Segunda etapa experimental

Os animais foram infectados com aproximadamente 2×10^7 UFC da cepa virulenta de *R. equi*, através de inoculação pela via intratraqueal no 28º dia de vida.

4.7 Acompanhamento clínico

Os potros foram monitorados diariamente, desde o nascimento até os 70 dias de vida, avaliando-se os parâmetros clínicos descritos no quadro abaixo:

Estado Geral
Apetite
Frequência Respiratória
Frequência Cardíaca
Auscultação Pulmonar
Coloração de mucosas
Temperatura
Atitude
Hidratação
Presença de diarreia

Quadro 1 - Parâmetros clínicos analisados – Pirassununga 2007-2009

Durante a primeira etapa experimental foi realizada uma ultrassonografia dos animais duas semanas após o desafio. Na segunda fase, devido a indisponibilidade do aparelho de ultrassom, foi realizado o acompanhamento radiográfico dos animais, uma vez por semana, dos 21 dias de vida até 70 dias.

4.8 Coleta do sangue

A coleta foi realizada por venipunção da jugular, com anti-sepsia prévia (álcool-iodado) utilizando tubos vacutainers (BD-Becton, Dickinson and Company, SP, BR) com e sem anticoagulante (heparina sódica). Para a obtenção do soro, o sangue foi centrifugado por 15 minutos/1500 rpm/4°C e o soro transferido para microtubos que foram armazenados a -20°C.

4.9 Hemograma

Para avaliação da série vermelha foi utilizada a contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer e a determinação da concentração de hemoglobina, feita em aparelho de automação (Labquest, Bioplus, SP, BR). O estudo quantitativo e qualitativo da série branca foi realizado através da contagem em câmara de Neubauer, seguida de contagem diferencial em esfregaço corado pelo método de Rosenfeld (1947) e examinado por microscopia óptica. Para a dosagem de fibrinogênio, primeiramente foi realizada a dosagem de proteína total, onde o sangue total foi colocado em um tubo capilar, centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga e preparado para a leitura utilizando um refratômetro. Seguiu-se a dosagem de proteína total desnaturada; para tanto, o sangue total foi colocado em um tubo capilar, que foi aquecido em banho-maria, centrifugado novamente a 10000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga e preparado para a leitura em refratômetro. O valor do fibrinogênio foi obtido indiretamente através da diferença entre os valores de proteína total e proteína total desnaturada. Como referência foram utilizados os valores descritos no apêndice A.

Não foram realizados hemogramas de um animal do Grupo pyA e de um animal do Grupo vapA da primeira etapa experimental.

4.10 Dosagem de imunoglobulinas séricas específicas a antígenos do *R. equi*

Placas de poliestireno de 96 poços (NUNC, Inc. Naperville USA) foram incubadas com APTX (preparação semipurificada de VapA), na concentração de 1,5 µg por poço. A diluição foi feita em tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,6 (50 µL/poço). Após 24 horas de incubação a 4°C, o conteúdo líquido de cada poço foi removido através de lavagens sucessivas com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), seguindo-se bloqueio (100 µL/poço) com gelatina a 3% diluída em PBS-T, por 1 hora a 37°C, em banho maria. As placas foram lavadas uma vez com PBS-T e incubadas com as amostras de soro em diferentes diluições na solução de bloqueio, por 2 horas a 37°C. Após quatro lavagens com PBS-T, seguiu-se incubação com anticorpos anti-isotipos de imunoglobulinas de eqüinos conjugados a peroxidase (Bethyl Laboratories INC, Montgomery, Texas, USA). Após 1 hora de incubação a 37°C, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T e em seguida a reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição de 100 µL/poço da solução reveladora [peróxido de hidrogênio 0,1% (30 vol, 19 µL) (Merck S.A., Rio de Janeiro, Br), ortofenilenodiamina (5 mg), ácido cítrico 0,1 M (3 mL), fosfato de sódio 0,2 M (3,2 mL) pH 5,5 e água destilada (6,25 mL)], com incubação por 10 minutos ao abrigo da luz. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2 M. A leitura de absorbância foi feita em comprimento de onda de 490 nm em leitor automático de ELISA (Multiskan MMC/340 P, Version 2.20).

4.11 Separação das células mononucleares do sangue para ensaio de proliferação de linfócitos

Células mononucleares foram obtidas por centrifugação utilizando gradiente Histopaque (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO; specific gravity 1.0777) a partir do sangue periférico. Após

---

Material e Métodos

separação, as células foram lavadas três vezes com meio RPMI e ressuspensas em RPMI1640 contendo 0,2 mM de L-glutamina, 0,1 mM Hepes, 100 U/ml de penicilina e 100 µg de estreptomicina, contendo 10% de soro fetal bovino para análise de proliferação.

4.12 Ensaio de proliferação de linfócitos sanguíneos frente ao APTX

A suspensão celular foi distribuída, num volume de 200 µL/poço, em placas de 96 poços (2×10^6 células/poço) e cultivada com 20 µL de APTX em diferentes concentrações, Con-A (2,0 µg/mL), como controle positivo ou somente meio de cultura, como controle negativo por 5 dias a 37°C na presença de 5% de CO₂. Foi adicionado metil-3H-timidina (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil, BR) 8 horas antes de terminar a cultura, numa concentração de 0,5 µCi por poço. Ao término da cultura, a quantidade de timidina incorporada pelas células foi determinada utilizando-se um coletor automático de células (Cell Harvest, Cambridge Technology Inc., MA) e o nível de incorporação, refletindo a proliferação celular ocorrida, foi determinado em contador de cintilação líquida (LS-6500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). A média para contagem por minuto (cpm±SD) foi determinada em triplicata. O índice de proliferação encontrado foi resultante da razão entre os dados obtidos de conA e APTX.

4.13 Dosagem de citocinas por PCR em tempo real de células do sangue periférico

Optou-se pelo uso da técnica de PCR em tempo real, devido a pouca disponibilidade de anticorpos ou kits, específicos para eqüinos, com grau satisfatório de confiabilidade. Amostras de células do sangue periférico dos potros foram armazenadas em trizol a -80°C para a extração futura de RNAm. Os “primers” foram construídos com o auxílio do programa Primer Expression 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A seqüência dos RNAm das citocinas IL12p40, IL-4, IL-10 e IFN-γ foram obtidas no NCBI (ferramenta BLAST). As

---

Material e Métodos

seqüências dos “primers” escolhidos foram confrontadas com o banco de dados BLAST para verificação da ocorrência de similaridades com a seqüência de RNAm de outras proteínas.

As seqüências e os “primers” escolhidos, bem como as localizações dos mesmos dentro das seqüências e informações adicionais são apresentadas abaixo:

- RNAm IL12p40 de eqüino: NCBI Y11129

TGGAGAAATGGTGGTCCTCAC
TCAAGGTTTTGCCAGAGCCTA

- RNAm IL-4 de eqüino: NCBI AF305617

GGCAAGAATTCGTGCATGG
TGTTGAAGCACCTTTGCAGC

- RNAm IL-10 de eqüino: NCBI U38200

CAGACATCAAGGAGCACGTGA
TGCTCCACTGCCTTGCTCTTA

- RNAm IFN- γ de eqüino: NCBI U04050

GGTCCAGCGCAAAGCAATA
GGCCTCGAAATGGATTCTGA

Para a extração de RNA, adicionaram-se às amostras previamente estabilizadas à temperatura ambiente, 200 μ L de clorofórmio e incubou-se por 3 minutos. Após centrifugação, a fase aquosa contendo RNA foi transferida para microtubo “RNase free”. O RNA foi precipitado com álcool isopropílico, lavado, ressuspendido em água “RNase free” e quantificado. A síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de 4 μ g de RNA total foi

---

Material e Métodos

realizada pelo método da transcriptase reversa. A reação foi feita em volume final de 10 µL na presença dos seguintes reagentes: 1 µL de dNTPs 10 mM, 2,4 µL de cloreto de magnésio 25 mM, 4 µL de tampão de reação 5 X, 0,5 µL de inibidor de RNase e 1 µL de transcriptase reversa. As etapas da reação de transcrição reversa foram as seguintes: 1) anelamento a 25°C por 5 minutos; 2) síntese a 42°C por 60 minutos; 3) reação de inativação da enzima transcriptase reversa 70°C por 15 minutos. Os níveis de RNAm das citocinas descritas acima e do controle positivo β -actina foram medidos pela técnica de PCR em tempo real com auxílio do sistema detector de sequência ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O PCR foi conduzido em 20 µL de reação contendo os seguintes reagentes: 10 µL de tampão SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 10 x, 0,5 µL de “primer forward”, 0,5 µL de “primer reverse”, 1,5 µL de amostra (cDNA) e 7 µL de água. Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 50°C por 2 minutos, seguida de 10 minutos a 95°C, para ativar a enzima AmpliTaq Gold. Seguiram-se 40 ciclos de incubação a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Os resultados foram normalizados pelo controle positivo (β -actina) e o método de quantificação relativa (índice de estimulação) foi o delta-CT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) conforme descrito por Oliveira et al. (2010).

4.14 Coleta do lavado traqueobrônquico (LTB)

Com o animal em estação, com a cabeça e o pescoço estendido foi feita tricotomia e anti-sepsia de uma área de 10x10cm, na região média do pescoço e cranial à bifurcação do músculo estenocefálico. Foi introduzida uma cânula pela pele entre os anéis traqueais, atingindo o lúmen da traquéia. Através dessa cânula foi introduzido um cateter de polietileno (Cateter Central BD Intracath, SP, BR) até alcançar a região da carina. Através do cateter foram inseridos 20ml de solução fisiológica estéril 0,9%, a qual foi imediatamente aspirada por meio de sucção leve por seringa. Esse procedimento foi repetido duas vezes a fim de se recuperar um volume satisfatório com representatividade de células. O fluido recuperado de todos os lavados foi filtrado a fim de remover o muco e posteriormente centrifugado por

---

Material e Métodos

15 minutos/1500 rpm /4° C. O sobrenadante foi reservado e o “pellet” ressuspendido em 1 ml de solução salina.

4.15 Dosagem de citocinas por PCR em tempo real de células do LTB

A dosagem de citocinas do LTB foi realizada apenas nos animais da segunda etapa experimental. Amostras de células de LTB dos potros foram armazenadas em trizol a -80°C para a extração futura de RNAm. Os “primers” utilizados e o método realizado foram os mesmos realizados nas amostras de sangue periférico, conforme descrito no item 4.13.

4.16 Dosagem de IgA no LTB

A dosagem de imunoglobulina A foi realizada apenas nos animais da segunda etapa experimental. O ensaio de ELISA foi realizado para verificar a presença de anticorpos IgA anti-VapA no LTB de potros imunizados. O procedimento foi de acordo com o descrito no item 4.10. A concentração encontrada foi expressa em absorbância corrigida pelo fator de diluição.

4.17 Dosagem de ureia no LTB e no soro

A dificuldade encontrada na investigação de componentes de fluidos pulmonares é a variação quanto ao volume do fluido recuperado. Essa variação implica em limitação na

---

Material e Métodos

interpretação das mensurações de soluto, por isso é necessária a utilização de um marcador que indique o grau de diluição do fluido recuperado (KIRSCHVINK et al. 2001). Como marcador de diluição foi utilizado a ureia, cuja concentração foi quantificada tanto no soro, quanto no LTB.

As concentrações de ureia das amostras de LTB e de soro foram determinadas por método enzimático utilizando-se kit comercial (Urea FS, Diasys, Alte Strobe 9, Holzheim, RP, DEU), o processamento das amostras foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, e a leitura foi realizada em analisador bioquímico automatizado (Lysis, AMS, Via E. Bersanti 17, RO, ITA).

Os fatores de diluição obtidos das amostras de LTB nas três coletas foram determinados pela divisão do valor de ureia do soro pelo valor de ureia do LTB coletados do mesmo animal no mesmo momento, conforme descrito por Fernandes; Mori e Sanches (2001):

$$FD=US/ULTB$$

Sendo: FD = fator de diluição; US = ureia do soro; ULTB = ureia do LTB.

Os valores obtidos nos ensaios de dosagem de citocina e dosagem de IgA do LTB foram multiplicados pelo fator de diluição e divididos pelo volume de fluido recuperado, determinando um resultado mais preciso, expresso em mililitro.

4.18 Avaliação da presença de *R. equi* no fluido pulmonar

Alicotas de 100µL do LTB puro e diluído nas diluições 1/50 e 1/100 foram semeados em placas de ágar BHI. Após 48 horas de incubação, foi feita a verificação do crescimento das colônias de *R. equi* no ágar. A confirmação foi realizada através de testes bioquímicos de catalase e oxidase.

4.19 Avaliação do perfil celular do LTB

Amostras de 100µL de suspensões celulares foram centrifugadas a 28xg durante seis minutos, em citocentrífuga (Citospyn, Incibrás, SP, BR). As lâminas foram fixadas com álcool metílico e coradas pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura das lâminas foi realizada por microscopia óptica de imersão em aumento de 800x. Para a contagem diferencial foram analisadas 300 células.

4.20 Análise estatística dos resultados

Para a interpretação dos resultados obtidos em cada um dos grupos experimentais e correspondente a cada intervalo da cinética das respostas imunes humorais e cito-mediadas após a primeira administração da linhagem vacinal foi utilizada a análise de U de Mann-Whitney, não paramétrico para amostras não pareadas, cujo número mínimo de amostras foi 3. Os testes foram realizados utilizando-se o software BioEstat 5.0. Os valores de “p” foram representados em tabelas, considerando-se significância estatística quando $p < 0,05$. Os dados foram apresentados graficamente utilizando a mediana, por ser preferível à média, já que não é sensível a valores extremos quando a distribuição das amostras é muito variável (MASSAD et al., 2004). Para as observações clínicas foi realizada uma análise qualitativa e objetiva dos resultados.

4.21 Delineamento experimental

Após o nascimento, os potros foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, um grupo controle vacinado com *Salmonella* carreando o vetor pYA3137 (**Grupo pyA**) e outro com a cepa vacinal de *Salmonella* carreando o vetor pYA3137 com o gene para a proteína VapA (**Grupo vapA**).

Os seguintes tempos experimentais foram definidos:

- T1 – primeira imunização (1 dia de vida)
- T2 – segunda imunização (14 dias de vida)
- T3 – uma semana antes da infecção experimental (21 dias de vida)
- T4 – infecção experimental (28 dias de vida)
- T5 – uma semana após a infecção experimental (35 dias de vida)
- T6 – duas semanas após a infecção experimental (42 dias de vida)

Foram realizadas 6 coletas de sangue (T1-T6) em tubos com e sem anticoagulante nas duas etapas experimentais. Nas amostras de sangue coletadas com anticoagulante foram realizados hemogramas em todos os tempos experimentais (item 4.9), ensaio de proliferação de linfócitos *in vitro* nos tempos experimentais T1, T3, T5 e T6 (itens 4.11 e 4.12) e dosagem de citocinas por PCR em tempo real nos tempos experimentais T1, T3, T5 e T6 (item 4.13). As amostras de soro foram utilizadas para a dosagem de imunoglobulinas séricas (IgM, IgGa, IgGb e IgGT) capazes de reconhecer preparações de APTX (extrato total de parede de *R. equi*) nos tempos experimentais T1, T2, T4 e T6 pelo ensaio de ELISA (item 4.10).

Foram realizadas 3 coletas de lavado traqueobrônquico (T3, T5, T6) de todos os animais de ambas as etapas experimentais. O fluido coletado foi avaliado quanto à presença de *R. equi* (item 4.15), perfil celular (item 4.16), expressão de RNAm de citocinas (item 4.17) e dosagem de imunoglobulina A (IgA) capazes de reconhecer preparações de APTX (extrato total de parede de *R. equi*) pelo ensaio de ELISA (item 4.18) nos 3 tempos experimentais propostos.

5 RESULTADOS

5.1 Primeira etapa experimental

Dois dos cinco potros do Grupo pyA foram retirados do experimento devido ao óbito por septicemia (Apêndice B e C). Em todas as amostras coletadas dos dois animais foi possível isolar e identificar bioquimicamente a bactéria *Serratia sp.*

5.1.1 Acompanhamento clínico

Todos os animais imunizados de ambos os grupos apresentaram diarreia transitória com duração média de 24 horas após o T1. Um animal do Grupo vapA, logo após ingerir o colostro começou a apresentar diarreia pastosa. No dia seguinte a diarreia tornou-se líquida e o animal começou a apresentar sinais de desidratação progressiva e hipertermia (39.3°C). Foi feito tratamento com antiinflamatório (Flunixin Meglumine) por 2 dias, sem sucesso. Tendo em vista a diarreia persistente e o estado de desidratação do animal, optou-se por iniciar tratamento com antibiótico. Foi administrado Gentamicina, durante 7 dias, e ao final do tratamento o animal já não apresentava alteração clínica. Outro animal do Grupo vapA, apresentou, sete dias após o desafio, hipertermia que chegou a 40,1°C e retornou à normalidade apenas 20 dias após o início. A alteração da temperatura corpórea foi associada à infecção por *Theileria equi*. Durante esse período o animal alternou o seu estado geral entre bom e regular, porém sem perder o apetite e sem apresentar outras alterações. Os outros animais desse grupo não apresentaram alterações significativas em nenhum dos parâmetros clínicos analisados exceto na auscultação pulmonar, onde foram identificados sibilos e estertores pulmonares em todos os animais, sendo que em 66% deles os sons anormais

Resultados

puderam ser auscultados quatro dias após o T4 e em 34% deles, seis dias antes do T4. Todos os animais apresentaram sons pulmonares normais em até 30 dias após o T4.

Nenhum dos animais do Grupo pyA apresentou alterações significativas nas frequências respiratória e cardíaca, temperatura corpórea e atitude. À auscultação pulmonar, foram identificados sibilos e estertores pulmonares em todos os animais desse grupo ao redor de 3 dias antes do T4, com persistência até o último dia analisado.

Pela análise da imagem ultrassonográfica realizada no T6 foi possível observar o desenvolvimento de abscesso pulmonar, em 33% dos animais do Grupo vapA, sendo um deles o mesmo que apresentou infecção por *Theileria equi* (Figura 2), e em 66% dos animais do Grupo pyA. (Figura 3). Os outros animais não apresentaram imagens sugestivas de comprometimento pulmonar (Figura 4).

Figura 2 - Imagem ultrassonográfica do pulmão de um animal do Grupo vapA no T6
Seta: imagem sugestiva de abscesso pulmonar

Figura 3 - Imagem ultrassonográfica do pulmão de um animal do Grupo pyA no T6
Setas: imagens sugestivas de abscesso pulmonar

Figura 4 - Imagem ultrassonográfica pulmonar sem alterações

5.1.2 Alterações Hematológicas

Na maioria (66%) dos animais do Grupo vapA foi possível identificar uma leucocitose associada a neutrofilia, principalmente nos exames feitos após o T4 (Apêndice D, Tabelas 13 a 19). Houve também uma leucocitose após infecção experimental nos animais (66%) do Grupo pyA, porém de maneira mais branda. As dosagens de fibrinogênio sofreram algumas alterações após o T4 (Apêndice D). No animal do Grupo vapA que apresentou infecção por *Theileria equi* ocorreu um grande aumento na contagem total de leucócitos em relação aos valores de referência (Apêndice D; Tabela 15) após o T4; a leucocitose associou-se a neutrofilia.

Os valores de monócitos e eosinófilos de todos os animais de ambos os grupos experimentais mantiveram-se dentro do valor de referência.

5.1.3 Dosagem de imunoglobulinas séricas

Nos animais do Grupo vapA ocorreu um aumento de produção de todas as imunoglobulinas estudadas após o T2, principalmente IgGa, IgGb e IgM. O isotipo IgGT apresentou marcado aumento apenas no T6, porém os isotipos IgGa e IgGb permaneceram em concentrações superiores (Figura 5) até o ultimo tempo estudado.

Figura 5 - Representação da mensuração dos isotipos de imunoglobulinas eqüinas em diferentes amostras de soro obtidas de animais do Grupo vapA

Nos animais do Grupo pyA, o isotipo IgGa apresentou aumento de concentração a partir do T2. O isotipo IgGb apresentou pequeno aumento de concentração após o T4. A imunoglobulina IgM apresentou aumento de concentração a partir do T1 e foi superior a concentração encontrada nos animais do Grupo vapA, apresentando diferença estatisticamente significativa no T2 (Tabela 1). O isotipo IgGT aumentou 3 vezes do T2 ao T4 e duplicou do T4 em relação ao T6 (Figura 6). Quando comparado ao Grupo vapA pode-se observar que a concentração sérica de IgGT dos animais do Grupo pyA foi 5 vezes superior no T4 e duas vezes superior no T6, apresentando diferença estatisticamente significativa (Tabela 1).

Resultados

Figura 6 - Representação da mensuração de diferentes isotipos de imunoglobulinas séricas eqüinas em diferentes amostras de soro obtidas de animais do Grupo pyA

Tabela 1 - Valores de “p” obtidos para comparação das concentrações dos isotipos de imunoglobulinas séricas dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2008

Isotipos	Tempos			
	T1	T2	T4	T6
IgGa	0.5186	0.1213	0.7963	0.6056
IgM	0.0707	0.0389*	0.4386	0.4386
IgGb	0.6056	0.4386	0.4386	0.3017
IgGT	0.1967	0.1213	0.0201*	0.0389*

* $p \leq 0,05$

5.1.4 Proliferação de linfócitos sanguíneos frente ao APTX

Os animais do Grupo vapA mantiveram uma atividade linfoproliferativa frente ao estímulo específico semelhante à encontrada nos animais do Grupo pyA até o T3. A partir do T4 houve um aumento da atividade proliferativa dos linfócitos dos animais do Grupo vapA e a atividade máxima foi desenvolvida pelos animais desse grupo no T6 (Figura 7), apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos animais do Grupo pyA com valor de “p” igual a 0,0389 (Tabela 2).

Figura 7 - Representação do índice de proliferação de linfócitos sanguíneos do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Resultados

Tabela 2 - Valores de “p” obtidos para comparação dos índices de proliferação dos linfócitos sanguíneos dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2008

	Tempos			
	T1	T3	T5	T6
Índice de proliferação de linfócitos	0,4386	0,7963	0,6056	0,0389*
*p≤0,05				

5.1.5 Expressão de citocinas por células do sangue periférico analisadas por PCR em tempo real

Níveis superiores de citocinas do padrão Th1 foram observados em amostras de células do sangue periférico analisadas por PCR em Tempo Real dos animais do Grupo vapA em comparação com os animais do Grupo pyA (Figura 8), porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa em nenhum dos tempos analisados (Tabela 3). O pico de expressão de INF- γ foi observado em ambos os grupos no T5. A expressão de IL-12 pelos animais do Grupo vapA foi observada mais tardiamente e em menor concentração quando comparada à expressão de INF- γ , porém foi superior quando comparada a expressão pelos animais do Grupo pyA. A expressão máxima dessa citocina foi observada no T6 e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos tempos analisados (Tabela 3).

Figura 8 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IFN- γ e IL-12p40, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células mononucleares de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Com relação a IL-4 houve uma expressão semelhante por ambos os grupos até o T3. No T5 observou-se uma expressão 2 vezes superior pelo Grupo pyA em relação ao Grupo vapA. A comparação entre os grupos experimentais demonstrou que a diferença na expressão de IL-4 no T5 foi estatisticamente significativa (Tabela 3). Observou-se uma expressão superior de IL-10 nos T3 e T5 pelo Grupo vapA, quando comparado ao Grupo pyA (Figura 9), porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

Figura 9 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IL-4 e IL-10, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células mononucleares de animais do Grupo vapA (vapA) e do Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Resultados

Tabela 3 - Valores de “p” obtidos para comparação da expressão de citocinas no sangue periférico dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2008

Citocinas	Tempos			
	T1	T3	T5	T6
INF- γ	0,4386	0,3017	0,3017	0,1213
IL-12	0,7963	0,1556	0,1213	0,6056
IL-4	0,3017	0,4386	0,0201*	0,1967
IL-10	0,4386	1	0,6056	0,6056

* $p \leq 0,05$

5.1.6 Avaliação da presença de *R. equi* no fluido pulmonar

A recuperação de *R. equi* no T3 variou entre os grupos, sendo recuperada em 66% dos animais do Grupo pyA e em 50% dos animais do Grupo vapA. Já na coleta do T5, pode-se recuperar a bactéria nos lavados coletados de todos os animais. Na terceira coleta (T6) apenas um animal do Grupo vapA já não apresentava mais a bactéria no fluido coletado (Tabela 4).

Resultados

Tabela 4 - Presença (+) ou Ausência (-) de *R. equi* no LTB dos animais do Grupo vapA e do Grupo pyA nos diferentes tempos experimentais. Pirassununga, 2008

Animal	T3			T5			T6		
	P	50	100	P	50	100	P	50	100
pyA 1	—	—	—	+	+	—	+	+	—
pyA 2	+	+	+	+	+	+	+	+	—
pyA 3	+	+	—	+	+	+	+	+	—
vapA 1	—	—	—	+	+	+	+	+	—
vapA 2	—	—	—	+	+	+	+	+	—
vapA 3	+	+	+	+	+	+	+	+	—
vapA 4	—	—	—	+	—	—	—	—	—
vapA 5	+	+	—	+	+	+	+	+	—
vapA 6	+	+	—	+	+	+	+	—	—

P: LTB puro.

50: LTB diluído 1/50 em solução fisiológica.

100: LTB diluído 1/100 em solução fisiológica.

5.1.7 Avaliação do perfil celular do LTB

Na primeira coleta dos animais do Grupo vapA a linhagem celular que predominou foi o macrófago, enquanto nos animais do Grupo pyA foi o neutrófilo (Figura 10). Após a infecção experimental ocorreu um aumento de neutrófilo no LTB dos animais de ambos os grupos, porém de maneira mais pronunciada nos animais do Grupo vapA. A partir do T5 ocorreu um

Resultados

progressivo aumento de macrófagos e conseqüente diminuição da concentração de neutrófilos em ambos os grupos. As concentrações de linfócitos mantiveram-se baixas em ambos os grupos, durante todo o período analisado (Figura 10). A análise dos resultados não demonstrou diferença estatisticamente significativa na porcentagem das linhagens celulares em nenhum dos tempos experimentais (Tabela 5).

Figura 10 - Porcentagem de células provenientes dos diferentes LTBs de animais do Grupo vapA (vapA) e Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Resultados

Tabela 5 - Valores de “p” obtidos para comparação da porcentagem do tipo celular recuperado do LTB dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2008

Tipo celular	Tempos		
	T3	T5	T6
Macrófagos	0.4386	0.7963	0.1967
Neutrófilos	0,6056	0,7963	0,1967
Linfócitos	0,4386	0,4386	0,7963

* $p \leq 0,05$

5.2 - Segunda Etapa Experimental

Foram imunizados apenas 3 animais no Grupo pyA, pois uma égua sofreu abortamento (Apêndice E) e um potro veio à óbito por enterocolite necrosante com 12 horas de vida (Apêndice F).

5.2.1 Acompanhamento clínico

Não foi observado nenhum efeito tóxico proveniente da imunização em nenhum dos animais estudados. Em 20% dos potros do Grupo vapA foram observadas alterações com relação a frequência respiratória, frequência cardíaca e temperatura corpórea após a infecção experimental. Essas alterações foram observadas de maneira intermitente, com pequeno aumento das frequências cardíaca e respiratória em comparação aos valores fisiológicos. A temperatura corpórea manteve-se acima dos valores normais (média de 39,3°C) a partir do terceiro dia após a infecção. Tais alterações clínicas não foram mais

---

Resultados

observadas no T6. Não foram observadas alterações nos outros parâmetros analisados. Em um desses animais, ficou constatada uma falha parcial de transferência passiva. Essa constatação foi feita pela realização do teste de sulfato de zinco, onde o soro sanguíneo apresentou baixa concentração de imunoglobulinas. Optou-se por dar continuidade aos experimentos, por ser essa uma condição comum em diferentes haras. Ao redor dos quinze dias de vida o potro começou a apresentar sintomas de gastrite, como bruxismo, salivação, anorexia, apatia e leve desidratação. Após uma semana de tratamento adequado o potro voltou a comer normalmente. Com relação a auscultação pulmonar dos animais desse grupo, foram identificados sibilos e estertores pulmonares anormais em todos os animais, em média quatro dias após o T4 com resolução completa em até 20 dias após o desafio.

Em relação aos animais do Grupo pyA, 66,6% dos potros começaram a apresentar alterações significativas nas frequências respiratória e cardíaca, temperatura e atitude ao redor do 26º dia de vida. Após o T4 o quadro clínico de ambos se agravou, chegando a temperatura corpórea de um dos animais a 41,5°C. À auscultação pulmonar, foram identificados sibilos e estertores pulmonares ao redor de 10 dias antes do T4, com persistência até o último dia analisado. Os dois animais vieram a óbito por falência respiratória, um com 45 dias de vida e o outro com 37 dias de vida.

O outro animal pertencente a esse grupo, não apresentou alterações clínicas significativas com exceção da presença de estertores pulmonares que persistiram durante todo o período analisado.

Utilizando a radiografia seriada foi possível observar o desenvolvimento de pneumonia em todos os animais estudados de ambos os grupos, incluindo imagens sugestivas de abscessos em alguns deles. Foi possível identificar também a resolução ou a diminuição da intensidade da pneumonia nos animais do Grupo vapA (Figura 11).

Resultados

Figura 11 - Imagem radiográfica pulmonar de um potro do Grupo vapA, 7 dias após a infecção experimental. A: pulmão direito; B: pulmão esquerdo

Pela imagem radiográfica dos dois animais que vieram a óbito ficou constatado o grau de comprometimento pulmonar pela presença de inúmeros abscessos (Figura 12). As duas imagens foram realizadas três dias antes do óbito dos animais.

Resultados

Figura 12 - Imagens radiográficas do pulmão de dois potros do Grupo pyA . A: pulmão direito do animal 1; B: pulmão esquerdo do animal 1; C: pulmão direito do animal 2; D: pulmão esquerdo do animal 2. Setas: imagens de lesões radiodensas sugestivas de abscessos

Na necropsia foram observados abscessos por todo o pulmão (Figura 13). Não foram observados abscessos em outras localizações.

Figura 13 - Presença de abscesso por todo o pulmão dos animais do Grupo pyA que vieram a óbito. A: animal 1; B: animal 2

5.2.2 Alterações hematológicas

Na maioria dos animais do Grupo vapA (80%) foi possível identificar uma leucocitose por neutrofilia, principalmente nos exames feitos após o T4. As dosagens de fibrinogênio mantiveram-se acima dos valores de referência em muitos animais mesmo antes do desafio experimental, porém de maneira heterogênea (Apêndice G, Tabelas 20 a 27).

Em 100% dos animais do Grupo pyA, a contagem total de leucócitos se apresentou acima do valor de referência antes do T4 (Apêndice A). Após o T4 esse valor continuou

---

Resultados

elevado, porém de maneira mais significativa no único animal sobrevivente do Grupo pyA. Com relação á dosagem de fibrinogênio, elas se mantiveram muito acima dos valores de referência e, em um dos animais que vieram a óbito ela se apresentou muito aumentada a partir do T2, chegando a valores de 1200mg/dl (Apêndice G; Tabelas 25 e 26).

Muitos animais apresentaram alterações no eritrograma, como anemia e hipohemoglobinemia (Apêndice G, Tabelas 21 a 25). Tal fato ocorreu pelo aparecimento de hemoparasitoses nesses animais.

5.2.3 Dosagem de imunoglobulinas séricas

Nos animais do Grupo vapA, houve aumento de produção de todos os isotipos estudados após o T2, com prevalência do isotipo IgGb, seguido por IgGM e IgGa. O isotipo IgGT apresentou marcado aumento após o T4, porém permaneceu em concentração inferior ao IgGb. As concentrações de IgGa e IgM apresentaram pouca variação do T4 para o T6 (Figura 14).

Resultados

Figura 14 - Representação da mensuração de diferentes isotipos de imunoglobulinas eqüinas em diferentes amostras de soro obtidas de animais do Grupo vapA

Nos animais do Grupo pyA houve um aumento na produção de IgGT após o T2 e nos tempos seguintes, sendo este o isotipo que apresentou maior concentração no T6. O isotipo IgGa sofreu um aumento do T2 ao T4 e do T4 ao T6. Ocorreu aumento crescente na concentração do isotipo IgGb até o T6, porém a manteve-se inferior ao isotipo IgGT (Figura 15). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações dos isotipos de imunoglobulinas séricas dos animais dos diferentes grupos experimentais em nenhum dos tempos analisados (Tabela 6).

Resultados

Figura 15 - Representação da mensuração dos isotipos de imunoglobulinas eqüinas em diferentes amostras de soro obtidas de animais do Grupo pyA

Tabela 6 - Valores de “p” obtidos para comparação das concentrações dos isotipos de imunoglobulinas séricas dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009

Isotipos	Tempos		
	T1	T2	T4
IgGa	0,8815	0,6547	0,6547
IgM	0,2888	0,2888	0,4795
IgGb	0,8815	0,8815	0,8815
IgGT	0,4561	0,6547	0,6547

*p≤0,05

5.2.4 Proliferação de linfócitos do sangue frente ao APTX

Os animais do Grupo vapA mantiveram uma atividade linfoproliferativa frente ao estímulo específico semelhante à encontrada nos animais do Grupo pyA até o T3, não sendo

Resultados

encontrada diferença estatisticamente significativa (Tabela 7). Já no T5 os animais do Grupo vapA apresentaram uma atividade linfoproliferativa três vezes superior à encontrada nos animais do Grupo pyA, porém não foi possível analisar se houve diferença estatística já que um animal do Grupo pyA veio a óbito, ficando o grupo com número insuficiente de animais para realização da comparação. No T6 a atividade linfoproliferativa volta a ser semelhante em ambos os grupos (Figura 16).

Figura 16 - Representação do índice de proliferação de linfócitos sanguíneos de animais imunizados do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Tabela 7 - Valores de “p” obtidos para comparação dos índices de proliferação dos linfócitos sanguíneos dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009

	Tempos	
	T1	T3
Índice de proliferação de linfócitos	0,6547	0,6547

* $p \leq 0,05$

5.2.5 Expressão de citocinas por células do sangue periférico analisadas por PCR em tempo real

Níveis superiores de citocinas do padrão Th1 foram observados em amostras de células do sangue periférico analisadas por PCR em Tempo Real dos animais do Grupo vapA em comparação com os animais do Grupo pyA. A expressão de INF- γ foi superior nos animais do Grupo vapA nos tempos experimentais T1, T3 e T5, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa (Tabela 8). O pico de expressão de IL-12 foi observado no T3 no Grupo vapA e foi 350 vezes superior à expressão nos animais do Grupo pyA (Figura 17), apresentando diferença estatisticamente significativa para um “p” de 0,0253 (Tabela 8).

Figura 17 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IFN- γ e IL-12p40, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células mononucleares de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Com relação as citocinas do padrão Th2 analisadas, houve expressão semelhante de IL-4 nos dois grupos experimentais até o T3. No T5 foi observada expressão duas vezes superior dessa citocina no Grupo pyA em relação ao Grupo vapA. Com relação a IL-10 houve uma produção três vezes superior no Grupo vapA em relação ao Grupo pyA no T3 (Figura 18). Não houve diferença estatisticamente significativa para a expressão das citocinas de padrão Th2 entre os grupos experimentais em nenhum dos tempos analisados (Tabela 8).

Figura 18 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IL-4 e IL-10, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células mononucleares de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Resultados

Tabela 8 - Valores de “p” obtidos para comparação da expressão de citocinas no sangue periférico dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009

Citocinas	Tempos		
	T1	T3	T5
INF- γ	0,2967	0,1797	0,0526*
IL-12	0,1797	0,0253*	0,6547
IL-4	0,6547	0,6547	0,4561
IL-10	0,6547	0,8815	0,6547

* $p \leq 0,05$

5.2.6 Expressão de citocinas por células do LTB analisadas por PCR em tempo real

Níveis superiores de citocinas do padrão Th1 foram observados em amostras de células de LTB analisadas por PCR em Tempo Real dos animais do Grupo vapA em comparação com os animais do Grupo pyA, assim como nas amostras de sangue periférico. A expressão de IFN- γ foi semelhante em ambos os grupos nos T3 e T5, já no T6 a expressão dessa citocina foi 7 vezes superior nos animais do Grupo vapA quando comparada com a expressão nos animais do Grupo pyA. Com relação a expressão de IL-12 pode-se observar uma expressão 15 vezes superior no T5 nos animais do Grupo vapA quando comparada com a expressão nos animais do Grupo pyA, mostrando diferença estatisticamente significativa para um “p” de 0,0339 (Tabela 9). O pico de produção dessa citocina foi observado no T6, sendo que a expressão de IL-12 no T6 foi 850 vezes superior nos animais do Grupo vapA (Figura 19). Não foi possível analisar se houve diferença estatística entre os grupos no T6, já que um animal do Grupo pyA veio a óbito, ficando o grupo com número insuficiente de animais para realização da comparação estatística.

Figura 19 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IFN- γ e IL-12p40, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células do LTB de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Com relação a s citocinas do padrão Th2 analisadas houve uma expressão superior de IL-4 no Grupo pyA em relação ao Grupo vapA em todos os tempos analisados, mostrando diferença estatisticamente significativa no T3 para um “p” de 0,0339 e no T5 para um “p” de 0,0253 (Tabela 9). No T6 houve uma queda na expressão de IL-4 no Grupo pyA, porém permaneceu superior em relação aquela do Grupo vapA. Com relação a IL-10 houve uma

Resultados

expressão superior no Grupo pyA no T5, já no T6 a expressão de IL-10 no Grupo vapA foi 2 vezes superior do que no Grupo pyA (Figura 20). Não foi possível analisar se houve diferença estatística entre os grupos no T6, já que um animal do Grupo pyA veio a óbito, ficando o grupo com número insuficiente de animais para realização da comparação estatística.

Figura 20 - Representação da expressão de RNAm para as citocinas IL-4 e IL-10, determinada por PCR em tempo real. Amostras de células do LTB de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Resultados

Tabela 9 - Valores de “p” obtidos para comparação da expressão de citocinas do LTB dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009

Citocinas	Tempos	
	T3	T5
INF- γ	0,1797	0,8815
IL-12	0,4561	0,0339*
IL-4	0,0339*	0,0253*
IL-10	0.1011	0.6547

* $p \leq 0,05$

5.2.7 Dosagem de IgA no LTB

Concentrações superiores de IgA foram observadas em amostras de LTB dos animais do Grupo vapA em comparação com os animais do Grupo pyA (Figura 21). Já na primeira coleta foi possível observar uma concentração de IgA 3,2 vezes superior nos animais do Grupo vapA, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa (Tabela 10). No T5 a concentração foi 4,3 vezes superior nos animais do Grupo vapA em comparação com a concentração encontrada no LTB dos animais controles, apresentando significância estatística para um valor de “p” de 0,0526 (Tabela 10).

Resultados

Figura 21 - Concentração pulmonar de IgA expressa em absorvância corrigida dos animais imunizados do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) durante o protocolo experimental.

Tabela 10 - Valores de “p” obtidos para comparação das concentrações de IgA no LTB dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009

	Tempos	
	T3	T5
IgA	0,1797	0,0526*

* $p \leq 0,05$

5.2.8 Avaliação da presença de *R. equi* no fluido pulmonar

Na primeira coleta (T3) foi possível recuperar a bactéria em altas concentrações de todos os animais estudados, fato que demonstra a ocorrência da infecção natural nesses animais. Na segunda coleta (T5), pode-se novamente recuperar a bactéria nos lavados coletados de todos os animais. Já na última coleta, a maioria dos animais do Grupo vapA já

Resultados

não apresentava mais a presença da bactéria no fluido coletado, enquanto os dois animais sobreviventes do Grupo pyA continuavam apresentando a bactéria no fluido pulmonar, mesmo nas amostras com maior diluição (Tabela 11).

Tabela 11 - Presença (+) ou Ausência (-) de *R. equi* no LTB antes e depois do desafio. Pirassununga, 2009

Animal	T3			T5			T6		
	P	50	100	P	50	100	P	50	100
pyA 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pyA 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pyA 3	+	+	+	+	+	+	/	/	/
vapA 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-
vapA 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
vapA 3	+	+	+	+	+	+	-	-	-
vapA 4	+	+	+	+	+	+	-	-	-
vapA 5	+	+	+	+	+	+	-	-	-

P: LTB puro

50: LTB diluído 1/50 em solução fisiológica

100: LTB diluído 1/100 em solução fisiológica

/: fluido não coletado devido a óbito

5.2.9 Avaliação do perfil celular do LTB

Nas três coletas de ambos os grupos experimentais a linhagem celular que predominou foi o neutrófilo. A partir da coleta do T5 ocorreu um aumento gradativo de macrófagos em ambos os grupos e de linfócitos apenas nos animais do Grupo vapA (Figura 22). A comparação entre as porcentagens de linfócitos no T5 demonstrou diferença estatisticamente significativa para um “p” de 0,0369 (Tabela 12).

Resultados

Figura 22 - Porcentagem de células provenientes da coleta de lavado traqueobrônquico de animais do Grupo vapA (vapA) ou Grupo pyA (pyA) obtidas durante o protocolo experimental

Resultados

Tabela 12 - Valores de “p” obtidos para comparação da porcentagem do tipo celular recuperado do LTB dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais nos diferentes tempos. Pirassununga, 2009

Tipo celular	Tempos	
	T3	T5
Macrófagos	0,136	0,551
Neutrófilos	0,233	0,1797
Linfócitos	0,233	0,0369*

* $p \leq 0,05$

6 DISCUSSÃO

Pelo fato da infecção ocorrer principalmente pela inalação de partículas de poeira contaminadas com a bactéria (MUSCATELLO et al., 2007) optou-se por utilizar a via intranasal para imunização dos potros experimentais. Devido à dificuldade de se obter um dispositivo de imunização intranasal por aspersão, foi realizada a injeção da linhagem vacinal na mucosa nasal na primeira etapa experimental. Optou-se por alterar a via de imunização, pois o procedimento de imunização nasal não se apresentou seguro para os animais, por ser muito invasivo, além disso, devido ao sangramento intenso da mucosa, uma parte do que era injetado refluía junto com o sangue, dificultando a administração correta da dose desejada. A via oral foi escolhida, por ser uma via amplamente utilizada em estudos que utilizam a *Salmonella* como linhagem vacinal (CONG et al., 2005; BRANGER et al., 2009). Pelos mesmos motivos que a via de imunização foi alterada para a segunda etapa experimental, a via de infecção também foi. Para infecção optou-se pela via intratraqueal por ser uma via que não permite dúvidas com relação a quantidade de inóculo administrado.

Recentes investigações epidemiológicas indicam que os potros que desenvolvem pneumonia por *R. equi* são infectados durante os primeiros dias de vida (HOROWITZ et al., 2001), ainda que os sinais clínicos se manifestem ao redor da quinta semana de vida (GUIGUÈRE et al., 2002). Devido a esse fato a dose inicial de uma vacina contra rodococose deve ser administrada na primeira semana de vida ou preferencialmente logo após o nascimento (LOPEZ et al. 2003). O protocolo vacinal utilizado nesse estudo foi delineado a partir de tal observação e baseando-se na afirmação que vacinas de DNA têm a habilidade de produzir proteção em neonatos, mesmo na provável presença de anticorpos maternos (CAPOZZO et al., 2004).

Os dois protocolos vacinais desencadearam resposta protetora, apesar de a resposta ter sido mais claramente visualizada nos animais imunizados com a linhagem vacinal pela via oral. Tal resultado pode ser em parte atribuído à mudança nas vias de imunização e infecção, já que houve maior segurança na dose administrada. Tal alteração pode também justificar a sobrevivência dos animais do Grupo pyA da primeira etapa experimental que

Discussão

provavelmente entraram em contato com um número inferior de bactérias. Além disso, nesse estudo foi utilizada uma dose de desafio inferior (2×10^7 UFC/potro) à relatada na literatura (1×10^9 UFC/potro), com o intuito de induzir uma doença inaparente mais próxima da situação encontrada na infecção natural, porém a despeito da baixa dose, todos os animais da segunda etapa experimental sofreram infecção, visto que a bactéria foi recuperada de todos os LTBs coletados antes da infecção experimental.

Muitas vezes os sinais clínicos apresentados pelos animais infectados incluem apenas um discreto aumento nas frequências respiratória e cardíaca e na temperatura, porém uma pequena porcentagem de potros chega a morte por estresse respiratório agudo com febre alta (41°C) ou sem apresentar sinal clínico respiratório (MEIJER; PRESCOTT, 2004). Essa diferença nas manifestações clínicas pode estar relacionada ao desafio, pois conforme observado por Jacks e Giguere (2010) potros desafiados com baixa dose de *R. equi* (1×10^6 /potro) não apresentaram alterações clínicas e nem evidências da doença, apesar de apresentarem abscessos pulmonares. Tal resultado está de acordo com o encontrado na primeira etapa desse estudo, onde nenhum animal de ambos os grupos apresentaram alterações clínicas sugestivas da rodococose. Já na segunda etapa experimental, onde o houve maior segurança na administração do desafio, observaram-se alterações clínicas, como taquicardia, taquipnéia e elevação da temperatura em alguns animais. Nos estudos sobre a patogenia da rodococose que utilizam uma dose de desafio alta ($>10^9$ UFC/potro), pode-se observar lesões pulmonares consideráveis com aparecimento de sinais clínicos exacerbados ao redor do 10º dia de infecção (GUIGUÈRE et al., 1999; HOOPER-McGREVY et al., 2001), assim como observado nos animais que vieram a óbito. Esse resultado pode estar relacionado com a presença de bactéria no pulmão desses animais antes do desafio experimental o que pode ter levado a uma concentração de *R. equi* no pulmão, superior a 2×10^7 UFC/potro. Já com relação a auscultação pulmonar foi possível identificar o aparecimento de estertores pulmonares em todos os potros, sendo que em alguns esses sinais estavam presentes antes do desafio experimental. Na necropsia foi observada grande quantidade de abscessos por todo o parênquima pulmonar, com comprometimento de mais de 50% da área pulmonar, resultado semelhante ao obtido por Jacks e Giguere (2010).

A avaliação da contagem total de leucócitos e da concentração de fibrinogênio são indicadores não específicos de inflamação e infecção. Um recente estudo indica que a

---

Discussão

contagem total de leucócitos e a concentração de fibrinogênio devem ser usados para uma identificação precoce de potros infectados com *R. equi*, sendo que a contagem total de leucócitos é significativamente melhor que a análise da concentração de fibrinogênio (SLOVIS, 2004). Tal indicação está de acordo com os resultados obtidos durante os ensaios, já que na maioria dos animais estudados foi possível identificar uma leucocitose por neutrofilia, principalmente no exame feito na ou nas semanas seguintes ao desafio experimental. Nesse estudo a contagem total de leucócitos foi importante na identificação da doença, mas não na determinação da gravidade da mesma, já que os dois animais que vieram a óbito na segunda etapa experimental apresentaram alterações precoces mais significativas na dosagem de fibrinogênio do que nas contagens totais de leucócitos, demonstrando que o neutrófilo tem um papel importante na proteção contra a bactéria. Tal resultado concorda com a observação feita por Chaffin et al. (2004) que a concentração sangüínea de neutrófilos, é significativamente menor em potros que irão desenvolver pneumonia por *R. equi*, do que em potros da mesma fazenda que não desenvolverão. Além disso, estudos demonstram que camundongos neutropênicos infectados com *R. equi* possuem concentração muito maior de *R. equi* nos tecidos quando comparados a camundongos controles (MARTENS et. al, 2005). Apesar de ter sido demonstrado que a função fagocítica de potros é menor do que a de cavalos adultos (DEMMERS et al., 2001; McTAGGART et al., 2001), mecanismos não fagocíticos parecem estar envolvidos na resposta imune contra *R. equi*. Resultados recentes demonstram que neutrófilos de potros promovem a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias como o INF- γ em resposta a estimulação *in vitro* por *R. equi* (NERREN et al., 2009).

Pela radiografia seriada foi possível observar o desenvolvimento de pneumonia em todos os animais estudados incluindo imagens sugestivas de piogranulomas em alguns deles, mesmo nos animais que não apresentavam sinais sistêmicos e respiratórios, resultado que concorda com as observações de Kosch (1984) e Lamb; O'Callaghan e Paradis (1990) de que radiografias seqüenciais permitem monitoração de alterações pulmonares e ainda podem revelar evidências de doença pulmonar em potros que não apresentam sinais respiratórios. Foi possível identificar também a resolução ou a diminuição da intensidade da pneumonia em todos os animais do Grupo vapA.

Discussão

Na primeira etapa experimental observou-se um aumento principalmente de IgGa após o T2 no Grupo vapA, porém com predomínio de IgGb até o último tempo analisado, resultado que contrasta com um estudo prévio, onde não foi detectada a produção de IgGb por potros antes dos 63 dias de vida (SHEORAN et al., 2000). Porém resultado similar foi encontrado por Jack et al. (2007b), que concluíram que potros muito jovens podem montar uma resposta de IgGb, desde que sejam corretamente estimulados. Nos animais do Grupo pyA ocorreu um grande aumento de IgGT após o T2, inclusive com diferença estatisticamente significativa nos tempos experimentais T4 e T6. Na segunda etapa experimental observou-se um aumento na produção de IgGb nos animais do Grupo vapA após T2. Observou-se também um aumento na produção de IgGT após o T4 nesses animais. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento de bactéria no pulmão, já que esses animais já tinham uma infecção e segundo Jacks e Giguere (2010) animais desafiados com altas doses de *R. equi* apresentam uma produção elevada de IgGT. Apesar da produção aumentada desse isotipo, o isotipo que predominou foi o IgGb, concordando com a expressão de citocinas de padrão Th1 nesses animais e a conseqüente sobrevivência. Houve uma grande produção de IgGT após o T4 nos potros do Grupo pyA. Tal resultado está condizente com o perfil de produção de citocinas observado e uma tendência a um perfil Th2 de resposta nos potros do Grupo pyA, já que o isotipo IgGT é relacionado a um fenótipo de suscetibilidade (HOOPER-McGREVY; WILKIE; PRESCOTT, 2003) a grandes desafios bacterianos (JACKS; GIGUERE, 2010).

O perfil de IgM sofreu pequeno aumento em ambos os grupos das duas etapas experimentais. Resultado semelhante foi encontrado por Jack et al. (2007b), que observaram aumento nas concentrações de IgM após a infecção de potros com *R. equi*, em comparação com o período de pré-infecção.

Cavalos adultos experimentalmente infectados rapidamente reduzem a infecção sem desenvolver a doença; a resposta imune inclui um aumento na contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ no lavado broncoalveolar e uma maior resposta linfoproliferativa ao *R. equi* pós-infecção (HINES et al., 2001). A resposta imune celular específica desenvolvida após a imunização com a *Salmonella* expressando VapA foi revelada pela intensa proliferação de linfócitos sanguíneos em resposta à estimulação *in vitro* com antígenos de *R. equi*, visualizada em ambas as etapas experimentais. Na primeira etapa experimental foi possível observar diferença estatisticamente significativa no T6 para esse ensaio. Já na segunda fase,

Discussão

apesar da diferença visual de proliferação entre os grupos ser clara, não foi possível realizar a análise estatística dos resultados, já que o Grupo pyA não mais compreendia o número mínimo de animais necessários para a análise. Tal resultado contrasta com resultados prévios observados por Jacks; Giguere e Prescott (2007) que relatam que potros têm uma resposta linfoproliferativa fraca contra antígenos de *R. equi* e por Hines et al. (2001) que afirmam que a resposta contra *R. equi* é compartimentalizada e pode ser detectada no pulmão, mas não no sangue periférico. Alguns autores têm reportado que a vacinação com antígenos distintos carregados por *Salmonella Typhimurium* atenuada está associada a uma resposta linfoproliferativa associada ao antígeno (CONG et al., 2005; DU; WANG, 2005).

Assim como observado por diversos autores, (BARRIOS et al., 1996; FORSTHUNBER; YIP; LEHMANN, 1996; ADKINS, 2005) apesar da tendência de desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2, neonatos corretamente imunizados conseguem montar uma resposta do tipo Th1 promovida na dependência da utilização do antígeno certo, da dose do antígeno, de sinais coestimulatórios e do tipo de adjuvante utilizado. Nos dois protocolos vacinais mostra-se uma maior expressão de citocinas do padrão Th1 nos animais do Grupo vapA, quando comparado aos animais do Grupo pyA. A expressão de IL-12 foi observada mais intensamente nos animais da segunda etapa experimental, mostrando diferença estatisticamente significativa no tempo experimental T3. Já a expressão de INF- γ foi mais pronunciada do que a expressão de IL-12 nos animais da primeira etapa experimental, porém a expressão foi superior nos animais do Grupo vapA das duas etapas experimentais. Não foram encontrados estudos em potros que demonstrassem a cinética de produção de citocinas após o desafio por *R. equi*. Neonatos humanos também têm habilidade de montar forte resposta Th1, visto que a vacinação de crianças com *Mycobacterium bovis*, um microorganismo muito similar ao *R. equi*, induz a produção de INF- γ na mesma magnitude do que em adultos (MARCHANT et al., 1999; VEKEMANS et al., 2001; OTA et al., 2002). Em recente estudo publicado por Smolen et al. (2010) ficou demonstrado que neonatos humanos conseguem montar uma resposta celular efetora quando corretamente estimulados. Os autores sugerem ainda que a imunização neonatal seja uma estratégia de saúde pública para combater as doenças associadas ao período de imaturidade imunológica.

A expressão da citocina IL-4 por células sanguíneas foi superior nos animais do Grupo pyA de ambas as etapas experimentais e apesar da sobrevivência dos animais a expressão

---

Discussão

foi maior pelos animais da primeira etapa experimental. A expressão de IL-4 por células pulmonares tem sido relacionada ao perfil de suscetibilidade, porém a expressão por células sanguíneas não foi relatada.

Não foi realizada a mensuração da expressão de citocinas por células pulmonares na primeira etapa experimental, porém na segunda etapa experimental foi possível observar uma expressão muito superior de IL-4 nos animais do Grupo pyA, quando comparado ao Grupo vapA, mostrando diferença estatisticamente significativa nos dois tempos experimentais que puderam ser analisados (T3 e T5). Essa pronunciada expressão de IL-4, foi vista principalmente nos dois animais que vieram a óbito, confirmando que uma resposta de padrão Th2 está envolvida com um fenótipo de suscetibilidade dos potros à infecção por *R. equi*. A expressão de citocinas do padrão Th1 por células pulmonares foi superior nos animais do Grupo vapA, visto que a expressão de INF- γ nesses animais foi 7 vezes superior a expressão nos animais do Grupo pyA, no T6. A expressão de IL-12, após a infecção experimental, foi estatisticamente superior nos animais do Grupo vapA, em comparação com os animais do Grupo pyA, concordando com a observação feita por Rahman e Fernandez (2009) que uma vacina eficiente deve promover uma resposta imunológica local.

Observou-se expressão de IL-10 duas vezes superior por células pulmonares nos animais do Grupo vapA quando comparada com a produção nos animais do Grupo pyA, no T6. Tal resultado foi também observado por Oliveira et al. (2010), utilizando a mesma linhagem vacinal em camundongos. O grupo concluiu que um alto nível de IL-10 associada à imunização com *Salmonella vapA* exerce um importante papel no controle da reação inflamatória contra a infecção por *R. equi*. Concordando com tal conclusão, estudos recentes têm demonstrado que células Th1 podem produzir IL-10, e que essa produção é essencial para a inibição de uma resposta Th1 exacerbada durante a infecção (ANDERSON et al., 2007; JANKOVICK, 2007).

Devido ao baixo número de animais estudados não foi possível realizar uma análise estatística de todos os tempos estudados na segunda etapa experimental, apesar disso visualmente foi possível observar que houve uma resposta proliferativa cito-mediada de padrão protetor Th1 mais pronunciada nos neonatos imunizados com a linhagem vacinal proposta, assim como Gunn et al. (2010) que produziram uma linhagem vacinal de

---

Discussão

Salmonella atenuada altamente imunogênica para camundongos de menos de 24 horas de vida.

A presença da IgA na mucosa do trato respiratório tem sido relacionada a uma maior resistência a rodococose (SHEORAN et al., 2000). Tal afirmação foi confirmada nesse estudo, onde a produção de IgA foi muito mais eficiente nos animais do Grupo vapA, que já apresentavam no primeiro dia avaliado, antes da infecção experimental (T3) uma concentração de IgA visualmente superior. Após a infecção experimental foi possível observar uma concentração ainda maior pelos animais do Grupo vapA em comparação com a concentração encontrada no LTB dos animais controles, inclusive com significância estatística. Concordando com tal resultado, diversos estudos têm demonstrado que o uso de vacinas de mucosa orais ou nasais contra agentes respiratórios (LUNN et al., 1999; NALLY et al., 2000; HOOPER-McGREVY; WILKIE; PRESCOTT, 2005) promovem a estimulação de uma resposta imune de mucosa.

Houve uma variação na proporção de células encontradas no primeiro LTB nas duas etapas experimentais. A proporção de macrófagos encontrados no T3 dos animais da primeira etapa experimental está de acordo com relatos de literatura (entre 24 e 65 %) (MORI; MORI; FERNANDES, 2001; HODGSON; HODGSON, 2003), indicativas de que o macrófago alveolar é o mais abundante tipo de células do aspirado traqueal de cavalos saudáveis. Já na primeira coleta (T3) de todos os animais da segunda etapa experimental, a célula que predominou foi o neutrófilo. Uma alta concentração de neutrófilos está tradicionalmente associada a uma infecção bacteriana (HEWSON; VIEL, 2002). Esses resultados são sustentados pelo resultado do exame microbiológico que demonstrou a presença da bactéria em todos os LTBs realizados antes do desafio experimental. Outra mudança observada no estudo citológico foi com relação ao número de linfócitos. Nas amostras dos animais da primeira etapa experimental foi observada uma baixa e estável proporção de linfócitos em relação aos outros tipos celulares. No entanto, os animais do Grupo vapA da segunda etapa experimental apresentaram um perfil cinético com aumento estatisticamente significativo da concentração de linfócitos. Esses resultados associaram-se à ausência de recuperação bacteriana nos LTB no período subsequente. Provavelmente o aumento de linfócitos contribuiu para promover o *clearance* do *R. equi* no pulmão, já que o *clearance* bacteriano em animais adultos está associado, entre outros fatores, com um

---

Discussão

significante aumento de linfócitos CD4+ e CD8+ no fluido do lavado traqueobrônquico (HINES et al., 2001). Nos animais da primeira etapa experimental, a baixa proporção de linfócitos não exclui a possibilidade de que haja predominância de subpopulações efectoras, que contribuem para promover o *clearance* do *R. equi* do pulmão.

Em nossos estudos um dos potros do Grupo pyA da segunda etapa experimental não desenvolveu a doença e se manteve clinicamente saudável durante o período analisado. Esse é um ponto que ainda não está totalmente esclarecido e existem diversos grupos pesquisando o motivo pelo qual alguns potros de fazendas endêmicas desenvolvem a doença, enquanto outros que estão no mesmo ambiente não desenvolvem. Existem algumas hipóteses, e uma delas seria a possibilidade da suscetibilidade e da resistência à bactéria serem determinada por diferenças nas funções imunológicas dos potros. Algumas evidências suportam essa hipótese: um estudo demonstrou que a relação entre células T CD4+/CD8+ em amostras de sangue de potros de duas semanas de vida foi significativamente menor em potros que desenvolveram a pneumonia posteriormente, do que em potros que não desenvolveram (CHAFFIN et al., 2004). Está claro que potros podem ser infectados a qualquer momento do primeiro mês de vida (HOOPER-McGREVY; PRESCOTT, 2001) e montar uma resposta imune efetiva contra o *R. equi* às três semanas de vida quando imunizados por via oral (HOOPER-McGREVY; WILKIE; PRESCOTT, 2005). Além disso, segundo Jacks et al. (2007), alguns potros podem se mostrar imunocompetentes e podem montar uma resposta imune contra as proteínas associadas à virulência semelhante a cavalos adultos. A resposta imune inata parece também estar envolvida nessa questão já que segundo Darrah et al., (2004) a estimulação eficiente da resposta imune inata é um dos fatores essenciais para a pronta resposta de cavalos adultos imunocompetentes à infecção por *R. equi*.

Outras hipóteses também vêm sendo discutidas, como o polimorfismo de alguns genes associados ao metabolismo do ferro no potro, já que se sabe que o ferro é importante para o crescimento e para a patogênese da bactéria e existem evidências que genótipos de transferrina diferem entre potros afetados e não afetados (MOUSEL et al., 2003). Além disso, recentemente foi observado que camundongos sem o gene para galectina-3 são mais resistentes à infecção por *R. equi* quando comparados a camundongos selvagens, esse fato

---

Discussão

pode ser explicado pela ausência das funções inibitórias da galectina-3 sobre o sistema imune (FERRAZ et al., 2008).

Tão importante quanto demonstrar a eficácia de uma vacina, é a demonstração de sua segurança para os potros e para o ser humano. Diferentes protocolos clínicos em seres humanos já foram estabelecidos utilizando linhagem de *Salmonella enterica* Typhimurium como vetor. Gunn et al. (2010) demonstrou a eficiência e a segurança de uma dose de 3×10^7 UFC/animal em camundongos de apenas quatorze horas de vida. Em cães encontrou-se uma dose limite tóxica em torno de 3×10^7 UFC/Kg, com sinais de febre refratária e vômitos (THAMM et al., 2005). Em nosso estudo utilizamos a dose de 1×10^7 UFC/animal, tanto pela via nasal, quanto pela via oral, e não observamos nenhum efeito tóxico nos animais. Em alguns animais vacinados pela via nasal observou-se uma diarreia transitória, com um dia de duração.

7 CONCLUSÕES

Os resultados aqui mostrados sugerem que a vacina vetorizada, baseada no uso de *Salmonella* atenuada carreando o gene que codifica a proteína VapA de *R. equi*:

- Foi segura para a administração em potros neonatos, já que não promoveu efeitos tóxicos.
- Promoveu um abrandamento nas manifestações clínicas nos animais imunizados.
- Promoveu um aumento da produção de isotipos de imunoglobulinas relacionados a resistência à bactéria.
- Promoveu uma resposta proliferativa antígeno - específica.
- Promoveu uma resposta celular do tipo Th1, confirmada pela expressão aumentada das citocinas INF- γ e IL-12 por células sanguíneas e do LTB.
- Promoveu modificação no perfil celular com aumento na concentração de linfócitos no LTB e conseqüente *clearence* da bactéria nos animais imunizados pela via oral.

REFERÊNCIAS

ADKINS, B. Development of neonatal Th1/Th2 function. **International Reviews of Immunology**, v. 19, n. 2-3, p. 157-171, 2000.

ADKINS, B. Neonatal T cell function. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 40, p. S5- S7, 2005. Supplement, 1.

AINSWORTH, D. M.; YEAGAR, A. E.; EICKER, S. W.; ERB, H. E.; DAVIDOW, E. Athletic performance of horses previously infected with *R. equi* pneumonia as foals. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43, 1997, Phoenix. Proceedings... Phoenix, 1997. p. 81-82.

AMATI, L.; PEPE, M.; PASSERI, M. E.; MASTRONARDI, M. L.; JIRILLO, E.; COVELLI, V. Toll-like receptor signalling mechanisms involved in dendritic cell activation: potential therapeutic control of T cell polarization. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 32, p. 4247-4254, 2006.

ANDERSON, C. F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. J.; SACKS, D. CD4 (+) CD25 (2) Foxp3 (2) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 285-297, 2007.

ARMSTRONG, J. A.; HART, D. P. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli: reversal of usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **Journal of Experimental Medicine**, v. 142, n. 1, p. 1-16, 1975.

ARMSTRONG, J. A.; HART, D. P. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 134, n. 3, p. 713-740, 1971.

BAGAZZARI, M. L.; BOYER, J. D.; JAVADIAN, M. A.; CHATTERGOON, M.; DANG, K.; KIM, G.; SHAH, J.; WANG, B.; WEINER, D. B. Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. **Journal of Medical Primatology**, v. 26, n. 1-2, p. 27-33, 1997.

BARRIOS, C.; BRANDT, C.; BERNEY, M.; LAMBERT, P. H.; SIEGRIST, C. A. Partial correction of the Th2/Th1 imbalance in neonatal murine responses to vaccine antigens through selective adjuvant effects. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 11, p. 2666-2670. 1996.

BECÚ, T.; POLLEDO, G.; GASKIN, J. M. Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 193-204, 1997.

Referências

- BEECH, J.; SWEENEY, C. R. Infections caused by bacteria, mycoplasma, parasites and fungi. In: BEECH, J. **Equine respiratory disorders**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991. p. 181-207.
- BENOIT, S.; BENACHOUR, A.; TAOUJI, S.; AUFRAY, Y.; HARTKE, A. H₂O₂ with causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3768-3776, 2002.
- BOT, A.; BONA, C. Genetic immunization of neonates. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 511-520, 2002.
- BOT, A.; BOT, S.; GARCIA-SASTRE, A.; BONA, C. A. DNA immunization of newborn mice with a plasmid-expressing nucleoprotein of influenza virus. **Viral Immunology**, v. 9, n. 4, p. 207-210, 1996.
- BOYLE, E. C.; BISHOP, J. L.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 1489-1495, 2007.
- BRANGER, C. G.; TORRES-ESCOBAR, A.; SUN, W.; PERRY, R.; FETHERSTON, J.; ROLAND, K. L.; CURTISS III, R. Oral vaccination with LcrV from *Yersinia pestis* KIM delivered by live attenuated *Salmonella* enteric serovar Typhimurium elicits a protective immune response against challenge with *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. **Vaccine**, v. 27, n. 39, p. 5363-5370, 2009.
- BREATHNACH, C. C.; STURGILL-WRIGHT, T.; STILTNER, J. L.; ADAMS, A. A.; LUNN, D. P.; HOROHOV D. W. Foals are interferon gamma-deficient at birth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 199-209, 2006.
- BYRNE, B. A.; PRESCOTT, J. F.; PALMER, G. H.; TAKAI, S.; NICHOLSON, V. M.; ALPERIN, D. C.; HINES, S. A. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 650-656, 2001.
- CAPOZZO, A. V. E.; CUBEROS, L.; LEVINE, M. M.; PASETTI, M. F. Mucosally delivered *Salmonella* Live Vector Vaccines Elicit potent immune responses against a foreign antigen in neonatal mice born to naive and immune mothers. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 8, p. 4637-4646, 2004.
- CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J. D. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* ssp. as carrier of foreign antigens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 3, p. 328-342, 1992.
- CÁRDENAS, L.; DASGUPTA, U.; CLEMENTS, J. D. Influence of strain viability and antigen dose on the use of attenuated mutants of *Salmonella* as vaccine carrier. **Vaccine**, v. 12, n. 9, p. 833-840, 1994.
- CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. The route of enteric infection in normal mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 139, n. 5, p. 1189-1203, 1974.

Referências

- CASTON, S. S.; McLURE, S. R.; MARTENS, R. J.; CHAFFIN, M. K. ; MILLES, K. G.; GRIFFT, R. W. ; COHEN, N. D. Effect of hyperimmune plasma on the severity of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in experimental infected foals. **Veterinary Therapeutics: Research in applied veterinary medicine**, v. 7, n. 4, p. 361-375, 2006.
- CAUCHARD, J.; SEVIN, C.; BALLEST, J. J.; TAOUJI, S. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with protective VapA candidate vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1-2, p.73-81, 2004.
- CHAFFIN, M. K.; COHEN, N. D.; MARTENS, R. J. Chemoprophylactic effects of azithromycin against *Rhodococcus equi* – induced pneumonia among foals at equine breeding farms with endemic infections. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 7, p. 1035-1047, 2008.
- CHAFFIN, M. K.; COHEN, N. D.; MARTENS, R. J.; EDWARD, R. F.; NEVILL, M. Hematologic and immunophenotypic factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals at equine breeding farms with endemic infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, n. 1-2, p. 33-48, 2004.
- CHAFFIN, M. K.; FAJT, V.; COHEN, N. D.; MARTENS, R. J.; BERNSTEIN, L. R. Pharmacokinetics of a methylcellulose oral formulation of gallium maltolate in neonatal foals. In: HAVEMEYER WORKSHOP ON *Rhodococcus equi*, 4., 2008. Edinburgh. **Proceedings...** Edinburgh, 2008. p. 63.
- CHATFIELD, S. N.; CHARLES, I. G.; MAKOFF, A. J.; OXER, M. D.; DOUGAN, G.; PICKARD, D.; SLATER, D.; FAIRWEATHER, N. F. Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. **Biotechnology**, v. 10, n. 8, p.888-892, 1992.
- CHATFIELD, S. N.; ROBERTS, M.; LONDONO, P.; CROPLEY, I.; DOUCE, G.; DOUGAN, G. The development of oral vaccines based on live, attenuated *Salmonella* strains. **FMES Immunology and Medical Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 1993.
- CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and accessible to exogenously added transferring. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 4, p.1-7, 1996.
- COHEN, N. D.; CARTER, C. N.; SCOTT, H. M.; CHAFFIN, M. H.; SMITH, J. L.; GRIMM, M. B.; KURSKIE, K. R.; TAKAI, S.; MARTENS, R. J. Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 3, p. 385–395, 2008.

Referências

- CONG, H.; GU, Q. M.; JIANG, Y.; HE, S. Y.; ZHOU, H. Y. Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 1-2, p. 29-35, 2005.
- COOMBS, D. K.; PATTON, T.; KOHLER, A. K.; SOBOLL, G.; BREATHNACH, C.; TOWNSEND, H. G.; LUNN, D. P. Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 111, n. 1-2, p.109-116, 2006.
- DARRAH, P. A.; HONDALUS, M. K.; CHEN, Q.; ISCHIROPOULOS, H.; MOSSER, D. M. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3587- 3593, 2000.
- DARRAH, P. A.; MONACO, M. C.; JAIN, S; HONDALUS, M. K.; GOLENBOCK, D. T.; MOSSER, D. M. Innate immune responses to *Rhodococcus equi*. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 1914-1924, 2004.
- DAVIS-SCIBIENSKI, C.; BEAMAN, B. L. Interaction of *Nocardia asteroides* with rabbit alveolar macrophages: effect of growth phase and viability on phagosome-lysosome fusion. **Infection and Immunity**, v. 29, n. 1, p. 24-29, 1980.
- DAWSON, T. R. M. Y.; HOROHOV, D. W.; MEIJER, W. G.; MUSCATELLO, G. Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 1-2, p. 1-11, 2010.
- DELESPESE, G.; YANG, L. P.; OHSHIMA, Y.; DEMEURE, C.; SHU, U.; BYUN, D. G.; SARFATI, M. Maturation of human neonatal CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes into Th1/ Th2 effectors. **Vaccine**, v. 16, n. 14-15, p. 1415-1419, 1998.
- DEMMERS, S.; JOHANNISSON, A.; GRONDAHL, G.; JENSEN-WAERN, M. Neutrophil functions and serum IgG in growing foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 7, p. 676–680, 2001.
- DEN HURK, S. V.; BRAUN, R. P.; LEWIS, P. J.; KARVONEN, B. C.; BABIUK, L. A.; GRIEBEL, P. J. Immunization of neonates with DNA encoding a bovine herpesvirus glycoprotein is effective in the presence of maternal antibodies. **Viral Immunology**, v. 12, n. 1, p. 67-77, 1999.
- DU, A.; WANG, S. Efficacy of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella Typhimurium* against *Eimeria tenella* infection in chickens. **International Journal of Parasitology**, v. 35, n. 7, p. 777-785, 2005.
- ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytocines in host defense against *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14-15, p. 1191-1200, 2001.
- EVEREST, P.; FRANKEL, G.; LI, J.; LUND, P.; CHATFIELD, S.; DOUGAN, G. Expression of LacZ from the htrA, nirB and groE promoters in a *Salmonella* vaccine

---

Referências

- strain: influence of growth in mammalian cells. **FMES Microbiology Letters**, v. 126, n. 1, p. 97-102, 1995.
- FERNANDES, W. R. **Estudo clínico e da dinâmica de imunoglobulinas séricas e no lavado bronco-alveolar de equinos experimentalmente infectados com herpesvírus equino tipo 1**. 2001. 92 f Tese de Livre Docência. - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.
- FERNANDES, W. R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 604-609, 2000.
- FERNANDEZ, S. A.; PRESCOTT, F. J.; NICHOLSON, M. V. Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA)-enriched antigens. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 187-192, 1997.
- FERRAZ, L. C.; BERNARDES, E. S.; OLIVEIRA, A. F.; RUAS, L. P.; FERMINO, M. L.; SOARES, S. G.; LOYOLA, A. M.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C.; HSU, D. K.; LIU, F. T.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Lack of galectin-3 alters the balance of innate immune cytokines and confers resistance to *Rhodococcus equi* infection. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 10, p. 2762-2775, 2008.
- FLAMINIO, M. J.; BORGES, A. S.; NYDAM, D. V.; HOROHOV, D. W.; HECKER, R.; MATYCHAK, M. B. The effect of CpG-ODN on antigen presenting cells of the foal. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2007.
- FLAMINIO, M. J.; NYDAM, D. V.; MARQUIS, H.; MATYCHAK, M. B; GIGUERE, S. Foal monocyte-derived dendritic cells become activated upon *Rhodococcus equi* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 2, p. 176–183, 2009.
- FLAMINIO, M. J.; RUSH, B. R.; DAVIS, E. G.; HENNESSY, K.; SHUMAN, W.; WILKERSON, M. J. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 3-4, p. 267–285, 2000.
- FOGARTY, U.; GRATH, P. M.; BUCKLEY, T. *Rhodococcus equi* in adult animals. In: HAVEMEYER WORKSHOP ON *Rhodococcus equi*, 4., 2008. Edinburgh. **Proceedings** ...Edinburgh, 2008. p. 64.
- FOOTE, C. E.; LOVE, D. N.; GILKERSON, J. R.; ROTA, J.; TREVOR-JONES, P.; RUITENBERG, K. M.; WELLINGTON, J. E.; WHALLEY, J. M. Serum antibody responses to equine herpesvirus 1 glycoprotein D in horses, pregnant mares and young foals. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 105, n. 1-2, p. 47-57, 2005.
- FORSTHUNBER, T.; YIP, H. C.; LEHMANN, P. V. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. **Science**, v. 271, n. 5256, p. 1728-1730, 1996.

Referências

GALÁN, J. E.; NAKAYAMA, K.; CURTISS III, R. Cloning and characterization of the *asd* gene of *S. typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. **Gene**, v. 94, n. 1, p. 29-35, 1990.

GARTON, N. J.; GILLERON, M.; BRANDO, T.; DAN, H. H.; GIGUERE, S.; PUZO, G.; PRESCOTT, J. F.; SUTCLIFFE, I. C. A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 227, n. 35, p. 31722-31733, 2002.

GEBERT, A. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 108, n. 6, p. 455-470, 1997.

GERMANIER, R.; FÜRER, E. Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of gal Emutants of *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 4, n. 6, p. 663-673, 1971.

GIGUERE, S.; PRESCOTT, F. J. Clinical manifestations, diagnosis, treatment and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 313-334, 1997.

GIGUERE, S.; GASKIN, J. M.; MILLER, C.; BOWMAN, J. L. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 1, p. 59-63, 2002.

GIGUERE, S.; HONDALUS, M. K.; YAGER, J. A.; DARRAH, P.; MOSSER, M. D.; PRESCOTT, J. F. Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3548-3557, 1999.

GIGUERE, S.; LEE, E.; WILLIAMS, E.; COHEN, N. D.; CHAFFIN, M. K.; HALBERT, N.; MARTENS, R. J.; FRANKLIN, R. P.; CLARK, C. C.; SLOVIS, N. M. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R. equi*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 237, n. 1, p. 74-81, 2010.

GIGUERE, S. *Rhodococcus equi* infections. Recent Advances in Equine Neonatal Care (Wilkins PA & Palmer JE, eds). International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: http://www.ivil.org/advances/Neonatology_Wilkins/giguere_rhodococcus/ivil. Acesso em: 25 maio 2008.

GRIMM, M. B.; COHEN, N. D.; SLOVIS, N. M.; MUNDY, G. D.; HARRINGTON, J. R.; LIBAL, M. C.; TAKAI, S.; MARTENS, R. J. Evaluation of fecal samples from mares as a source of *Rhodococcus equi* for their foals by use of quantitative bacteriologic culture and colony immunoblot analyses. **American Journal Veterinary Research**, v. 68, n. 1, p. 63-71, 2007.

Referências

- GUILLOBEL, H. C.; CARINHANHA J. I.; CARDENAS, L.; CLEMENTS J. D.; DE ALMEIDA D. F.; FERREIRA, L. C. Adjuvant activity of a nontoxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin on systemic and mucosal immune responses elicited against a heterologous antigen carried by a live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4349-4353, 2000.
- GUNN, B. M.; WANDA, S. Y.; BURSHELL, D.; WANG, C.; CURTISS, R. Construction of recombinant attenuated *Salmonella enterica* Typhimurium vaccine (RASV) vector strains for safety in newborn and infant mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 3, p. 354-362, 2010.
- GURTNER, V.; MAYALL, B. C.; SEVIOUR, R. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 377-403, 2004.
- HAAS, A.; LÜHRMANN, A.; MAUDER, N.; FERNANDEZ-MORA, E.; SCHULZE-LÜHRMANN, J. Cell biology of *R. equi* infected macrophages: Phagosome biogenesis and host cell toxicity. In: HAVEMEYER FOUNDATION WORKSHOP ON *Rhodococcus equi*, 2., 2002. Washington. **Proceedings...** Washington, 2002. p. 32.
- HAGHIGHI, H. R.; PRESCOTT, J. F. Assessment in mice of vapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 104, n. 3-4, p. 215-225, 2005.
- HEWSON, J. L.; VIEL, L. Sampling, microbiology and cytology of the respiratory tract In: LEKEUX, P. **Equine Respiratory Diseases**. 2002. Disponível em: <http://www.ivis.org/special_books/Lekeux?viel/chapter_frm.asp?LA=1> Acesso em: 12 jan 2008.
- HIETALA, S. K.; ARDANS, A. A. Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi*-exposed and non-exposed foals. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 307-320, 1987.
- HIGUCHI, T.; ARAKAWA, T.; HASHIKURA, S.; INUI, T.; SENBA, H.; TAKAI, S. Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 46, n. 9, p. 641-648, 1999.
- HIGUCHI, T.; TAHARAGUCHI, S.; HASHIKURA, S.; HAGIWARA, S.; GOJO, C.; SATOH, S.; YOSHIDA, M.; TAKAI, S. Physical and serologic examinations of foals at 30 and 45 days of age for early diagnosis of *Rhodococcus equi* infection on endemically infected farms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 7, p. 976-981, 1998.
- HINES, S. A.; STONE, D. M.; HINES, M. T.; ALPERIN, D. C.; KNOWLES, D. P.; NORTON, L. K.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4+ and CD8+ T

Referências

lymphocytes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 208-215, 2003.

HINES, T. M.; PAASCH, M. K.; ALPERIN, C. D.; PALMER, H. G.; WESTHOFF, C. N.; HINES, A. S. Immunity to *Rhodococcus equi*: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 79, n. 1-2, p. 101-113, 2001.

HODGSON, J. L.; HODGSON, D. R. Tracheal aspirates: indications, technique and interpretation. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**, 5 ed., St. Louis: Saunders, 2003. p. 401-406.

HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. D. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccine. **Nature**, v. 291, n. 5812, p. 238-239, 1981.

HONDALUS, M. K.; DIAMOND, S. M.; ROSENTHAL, A. L.; SPRINGER, A. T.; MOSSER, D. M. The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-1 to bind to mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2919-2929, 1993.

HONDALUS, M. K.; MOSSER, D. M. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4167-4175, 1994.

HONDALUS, M. K. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 257-268, 1997.

HOOPER-McGREVY, K.; GIGUERE, S.; WILKIE, B. N.; PRESCOTT, J. F. Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi* induced pneumonia. **American Journal Veterinary Research**, v. 62, n. 8, p. 1307-1313, 2001.

HOOPER-McGREVY, K.; PRESCOTT, J. F. Is fatal *Rhodococcus equi* pneumonia of foals only an infection acquired by the perinate? **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 3, p. 169-170, 2001.

HOOPER-McGREVY, K. E.; WILKIE, B. N.; PRESCOTT, J. F. Immunoglobulin G subisotype responses of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 3, p. 345-351, 2003.

HOOPER-McGREVY, K. E.; WILKIE, B. N.; PRESCOTT, J. F. Virulence-associated protein-specific serum immunoglobulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent *R. equi*. **Vaccine**, v. 23, n. 50, p. 5760-5767, 2005.

HOROWITZ, M. A. The Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 58, n. 6, p. 2108-2126, 1983.

Referências

HOROWITZ, M. L.; COHEN, N. D.; TAKAI, S.; BECU, T.; CHAFFIN, K. M.; CHU, K. K.; MAGDESIAN, K. G.; MARTENS, R. J. Application of Sartwell's model (lognormal distribution of incubation periods) to age at onset and age at death of 6 foals with *Rhodococcus equi* pneumonia as evidence of perinatal infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 3, p. 171-175, 2001.

HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, M. S. Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus* mutants under control of the anaerobically inducible nirB promoter. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1549-1556, 2000.

HUBBARD, R. D.; FLORY, C. M.; COLLINS, F. M.; COCITO, C. Immunization of mice with the antigen A60 of *Mycobacterium bovis* BCG. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 88, n. 1, p. 129-131, 1992.

JACKS, S.; GIGUERE, S.; CRAWFORD, P. C.; CASTLEMAN, W. L. Experimental infection of neonatal foals with *Rhodococcus equi* triggers adult-like gamma interferon induction. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2007.

JACKS, S.; GIGUERE, S. Effects of inoculum size on cell-mediated and humoral immune responses of foals experimentally infected with *Rhodococcus equi*: A pilot study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 133, n. 2-4, p. 282-286, 2010.

JACKS, S.; GIGUERE, S.; PRESCOTT, J. F. In vivo expression of cell-mediated immune responses to plasmid encoded virulence-associated proteins of *Rhodococcus equi* in foals. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 4, p. 369-374, 2007.

JAIN, S.; BLOOM, B. R.; HONDALUS, M. K. Deletion of *vapA* encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 115-128, 2003.

JAIN, V.; MEKALANOS, J. J. Use of lambda phage S and R gene products in an inducible lysis system for *Vibrio cholerae* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-based DNA vaccine delivery systems. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 986-989, 2000.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2001. 767 p.

JANKOVICK, D.; KULLBERG, M. C.; FENG, C. G.; GOLDSZMID, R. S.; COLLAZO, C. M.; WILSON, M.; WYNN, T. A.; KAMANACA, M.; FLAVELL, R. A.; SHER, A. Conventional Tbet(+) Foxp3(2) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 273-283, 2007.

JEPSON, M. A.; CLARCK, M. A. The role of M cells in *Salmonella* infection. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14-15, p. 1183-1190, 2001.

Referências

- JOHNSON, J. A.; PRESCOTT, J. F.; MARKHAM, R. J. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intrabronchial challenge. **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 4, p. 440-449, 1983.
- JONES, B. D.; GHORI, N.; FALKOW, S. S. Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying epithelial M cells of the Peyer's patches. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 1, p. 15-23, 1994.
- KANALY, S. T.; HINES, S. A.; PALMER, G. H. Cytokine Modulation Alters Pulmonary Clearance of *Rhodococcus equi* and Development of Granulomatous Pneumonia **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3037-3041, 1995.
- KANALY, S. T.; HINES, S. A.; PALMER, G. H. Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4⁺ T-lymphocyte-Deficient transgenic mice. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4929-4932, 1993.
- KANALY, S. T.; HINES, S. A.; PALMER, G. H.; KANALY, S. T.; HINES, S. A.; PALMER, G. H. Transfer of a CD4⁺ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p. 1126-1132, 1996.
- KASUGA-AOKI, H.; TAKAI, S.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; MADARAME, H.; NAKANE, A. Tumor necrosis factor and interferon- γ are required in host resistance against virulent *Rhodococcus equi* infection in mice: cytokine production depends on the virulence levels of *R.equi*. **Immunology**, v. 96, n. 1, p. 122-127, 1999.
- KIRSCHVINK, N.; FIÉVEZ, L.; DOGNÉ, S.; BUREAU, F.; ART T.; LEKEUX, P. Comparison of inulin with urea as dilutional markers of bronchoalveolar lavage in healthy and heaves-affected horses. **Veterinary Research**, v. 32, n. 2, p. 145-154, 2001.
- KNOTTENBELT, D. C. **Equine neonatology: medicine and surgery**. 1. ed. Philadelphia: Elsevier, 2004. 508p.
- KORVARIK, J.; SIEGRIST, C. A. Immunity in early life. **Immunology Today**, v. 19, n. 4, p. 150-152, 1998.
- KOSCH, P. C.; KOTERBA, A. M.; COONS, T. J.; WEBB, A. I. Developments in management of the newborn foals in respiratory distress 1: evaluation. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 4, p. 312-318, 1984.
- KULKARNI, R. R.; PARREIRA, V. R.; JIANG, Y. F.; PRESCOTT, J. F. A live oral recombinant *Salmonella* Typhimurium vaccine 1 expressing *Clostridium perfringens* antigens confer protection of broiler chickens against necrotic enteritis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 205-214, 2009.
- KULKARNI, R. R.; PARREIRA, V. R.; SHARIF, S.; PRESCOTT, J. F. Oral immunization of broiler chickens against necrotic enteritis with an attenuated *Salmonella* vaccine vector expressing *Clostridium perfringens* antigens. **Vaccine**, v. 26, n. 33, p. 4194-4203, 2008.

Referências

- LAMB, C. R.; O'CALLAGHAN, M. W.; PARADIS, M. R. Thoracic radiography in the neonatal foal: a preliminary report. **Veterinary Radiology**, v. 31, n. 1, p. 11-16, 1990.
- LANGONI, H. Rodococose. Uma maneira diferente de falar de pneumonia em potros causada pelo *Rhodococcus equi*. **Hippus**, n. 9, p. 57-59, 1994.
- LANGRISH, C. L.; BUDDLE, J. C.; THRASHER, A. J.; GOLDBLATT, D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 128, n. 1, p. 118-123, 2002.
- LAVOIE, J. P.; FISET, L.; LAVERTY, S. Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 5, p. 348-352, 1994.
- LEWIS, M. J.; WAGNER, B.; WOOF, J. M. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 3, p. 818-827, 2008.
- LI, Y.; WANG, S.; XIN, W.; SCARPELLINI, G.; SHI, Z.; GUNN, B.; ROLAND, K. L.; CURTIS, R. A sopB deletion mutation enhances the immunogenicity and protective efficacy of a heterologous antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* vaccines. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 5238-5246, 2008.
- LIAO, X. L.; REN, H.; ZHAO, P.; ZHU, S. Y.; CAO, J.; CHEN, Z. H.; ZHAO, L. J.; PAN, W.; FEITELSON, M. A.; QUI, Z. T. Efficient induction of mouse immuneresponses to hepatitis C virus by viral core protein-carrying attenuated *Salmonella* Typhimurium. **Viral Immunology**, v. 20, n. 3, p. 469-478, 2007.
- LIU, M.; LIU, T.; BORDIN, A.; NERREN, J.; COHEN, N. Activation of foal neutrophils at different ages by CpG oligodeoxynucleotides and *Rhodococcus equi*. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p. 280-289, 2009a.
- LIU, T.; NERREN, J.; LIU, M.; MARTENS, R.; COHEN, N.; Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals. **Vaccine**, v. 27, n. 5, p. 674-683, 2009b.
- LOPEZ, A. M.; HINES, M. T.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P.; ALPERIN, D. C.; HINES, S. A. Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the vapA of *Rhodococcus equi*. **Vaccine**, v. 21, n. 25-26, p. 3815-3825, 2003.
- LOPEZ, A. M.; HINES, M. T.; PALMER, G. H.; ALPERIN, D. C.; HINES, S. A. Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1270-1276, 2002.
- LUNN, D. P.; SOBOLL, G.; SCHRAM, B. R.; QUASS, J.; MCGREGOR, M. W.; DRAPE, R. J.; MACKLIN, M. D.; SWAIN, W. F.; OLSEN, C. W. Antibody response to DNA vaccination of horses using influenza virus haemagglutinin gene. **Vaccine**, v. 17, n. 3, p. 2245-2258, 1999.

- LURMMAN, A.; MAUDER, N.; SYDOR, T.; FERNANDES-MORA, E.; SCHULZE-LUEHRMANN, J.; TAKAI, S.; HAAS, A. Necrotic depth of *Rhodococcus equi*-infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 853-662, 2004.
- MADARAME, H.; TAKAI, S.; MORISAWA, N.; FUJII, M.; HIDAKA, D.; TSUBAKI, S.; HASEGAWA, Y. Immunohistochemical detection of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* in pulmonary lesions of foals. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 3, p. 341-343, 1996.
- MADIGAN, E. J.; HIETALA, S.; MULLER, S. N. Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 571-578, 1991.
- MAGNUSSON, H. Spezifische infektiöse pneumonie beim Fohlen. Ein neuer eiterreger beim Pferd. **Achieves Wises Pratt Toehold**, v. 50, p. 22-38, 1923.
- MANICKAN, E.; YU, Z.; ROUSE, B. T. DNA immunization of neonates induces immunity despite the presence of maternal antibody. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 9, p. 2371-2375, 1997.
- MARCHANT, A.; GOETGHEBUER, T.; OTA, M. O.; WOLFE, I.; CEESAY, S. J.; DE GROOTE, D.; CORRAH, T.; BENNETT, S.; WHEELER, J.; HUYGEN, K.; AABY, P.; MCADAM, K. P.; NEWPORT, M. J. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 4, p. 2249-2255, 1999.
- MARCHANT, A.; GOLDMAN, M. T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 141, n. 1, p. 10-18, 2005.
- MARODI, L. Innate cellular immune responses in newborns. **Clinical Immunology**, v. 118, n. 2-3, p. 137-144, 2006.
- MARTENS, R. J.; COHEN, N. D.; JONES, S. L.; MOORE, T. A.; EDWARDS, J. F. Protective role of neutrophils in mice experimentally infected with *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 7040-7042, 2005.
- MASSAD, E.; MENEZES, R. X.; SILVEIRA, P. S. P.; ORTEGA, N. R. S. **Métodos quantitativos em Medicina**. 1. ed. Barueri: Manole, 2004. 367 p.
- MCTAGGART, C.; YOVICH, J. V.; PENHALE, J.; RAIDAL, S. L. A comparison of foal and adult horse neutrophil function using flow cytometric techniques. **Research in Veterinary Science** v. 71, n. 1, p. 73-79, 2001.
- MEDINA, E.; PAGLIA, P.; NIKOLAUS, T.; MULLER, A.; HENSEL, M.; GUZMAN, C. A. Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella* Typhimurium are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1093-99, 1999.

Referências

- MEIJER, W. G.; PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p. 383-396, 2004.
- MERANT, C.; BREATHNACH, C. C.; KOHLER, K.; RASHID, C.; METER, P. V.; HOROHOV, D. W. Young foal and adult horse monocyte-derived dendritic cells differ by their degree of phenotypic maturity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 131, n. 1-2, p. 1-8, 2009.
- MIELCAREK, N.; ALONSO, S.; LOCHT, C. Nasal vaccination using live bacterial vectors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, n. 1-3, p. 55-69, 2001.
- MIRANDA-CASOLUENGO, R.; DUFFY, P. S.; O'CONNELL, E. P.; GRAHAM, B. J.; MANGAN, M. W.; PRESCOTT, J. F.; MEIJER, W. G. The iron-regulated iupABC operon is required for saprophytic growth of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* at low iron concentrations. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 10, p. 3438-3444. 2005.
- MOREIM, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQVIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3, p. 207-213, 2002.
- MORI, E.; MORI, C. M. C.; FERNANDES, W. R. Avaliação da função de macrófagos alveolares em cavalos clinicamente sadios. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 172-178, 2001.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in Immunology**, v. 46, p. 111-147, 1989.
- MOUSEL, M. R.; HARRISON, L.; DONAHUE, J. M.; BAILEY, E. *Rhodococcus equi* and genetic susceptibility: assessing transferrin genotypes from paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 5, p. 470-472, 2003.
- MUSCATELLO, G.; GILKERSON, J. R.; BROWNING, G. F. Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 734-737, 2009.
- MUSCATELLO, G.; LEADON, D. P.; KLAY, M.; OCAMPO-SOSA, A.; LEWIS, D. A.; FOGARTY, U.; BUCKLEY, T.; GILKERSON, J. R.; MEIJER, W. G.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of 'rattles'. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 5, p. 470-478, 2007.
- MUTHUKKUMAR, S.; GOLDSTEIN, J.; STEIN, K. E. The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 9, p. 4803-4813, 2000.
- NALLY, J. E.; ARTIUSHIN, S.; SHEORAN, A. S.; BURNS, P. J.; SIMON, B.; GILLEY, R. N.; GIBSON, J.; SULLIVAN, S.; TIMONEY, J. F. Induction of mucosal and systemic antibody specific for SEMF3 of *Streptococcus equi* by intranasal vaccination using sucrose acetate isobutyrate based delivery system. **Vaccine**, v. 19, n. 5, p. 492-497, 2000.

- NARDELLI-HAEFLINGER, D.; BENYACOUN, J.; LEMOINE, R.; HOPKINS-DONALDSON, S.; POTTS, A.; HARTMAN, F.; KRAEHEBUHL, J. P.; DE GRANDI, P. Nasal vaccination with attenuated *Salmonella typhimurium* strains expressing the hepatitis B nucleocapsid: dose response analysis. **Vaccine**, v. 19, n. 20-22, p. 2854-2861, 2001.
- NARREN, J. R.; MARTENS, R. J.; PAYNE, S.; MURRELL, J.; BUTLER, J. L. Age-related changes in cytokine expression by neutrophils of foals stimulated with virulent *Rhodococcus equi* in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 15, n. 127, p. 212-219, 2009.
- NETEA, M. G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 749-755, 2004.
- OLIVEIRA, A. F.; FERRAZ, L. C.; BROCCHI, M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the vapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 382-390, 2007a.
- OLIVEIRA, A. F.; PORTO, A. C. R.C.; FERRAZ, L. C.; FERRAZ, L. E. S.; BROCHI, M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SOARES, S. G. *Rhodococcus equi*: importância, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Medicina Equina**, n. 10, p. 06-09, 2007b.
- OLIVEIRA, A. F.; RUAS, L. P.; CARDOSO, S. A.; SOARES, S. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Vaccination of mice with *Salmonella* expressing VapA: mucosal and systemic TH1 responses provide protection against *Rhodococcus equi* infection. **Plos One**, v. 5, n. 1, p. e8644, 2010.
- OTA, M. O.; VEKEMANS, J.; SCHLEGEL-HAUETER, S. E.; FIELDING, K.; SANNEH, M.; KIDD, M.; NEWPORT, M. J.; AABY, P.; WHITTLE, H.; LAMBERT, P. H.; MCADAM, K. P.; SIEGRIST, C. A.; MARCHANT, A. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 2, p. 919-925, 2002.
- PARGASS, I. S.; WILLS, T. B.; DAVIS, W. C.; WARDROP K. J.; ALPERIN, D. C.; HINES, S. A. The influence of age and *Rhodococcus equi* infection on CD1 expression by equine antigen presenting cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 130, n. 3-4, p. 197-209, 2009.
- PATTERSON-KANE, J. C.; DONAHUE, J. M.; HARRISON, L. R. Placentitis, fetal pneumonia and abortion due to *Rhodococcus equi* infection in a Thoroughbred. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 2, p. 157-159, 2002.
- PATTON, K.; MCGUIRE, T.; HINES, M.; MEALEY, R.; HINES, S. *Rhodococcus equi*-specific cytotoxic T lymphocytes in immune horses and development in asymptomatic foals. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2083-2093, 2005.

- PEI, Y.; DUPONT, C.; SYDOR, T.; HAAS, A.; PRESCOTT, J. F. Cholesterol oxidase (ChoE) is not important in the virulence of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3-4, p. 240-246, 2006.
- PEI, Y.; PARREIRA, V.; NICHOLSON, V. M.; PRESCOTT, J. F. Mutation and virulence assessment of chromosomal genes of *Rhodococcus equi* 103. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 1, p. 1-7, 2007.
- PERKINS, G. A.; YEAGER, A.; ERB, H. N.; NYDAM, D. V.; DIVERS, T. J.; BOWMAN, J. L. Survival of foals with experimentally induced *Rhodococcus equi* infection given either hyperimmune plasma containing *R. equi* antibody or normal equine plasma. **Veterinary Therapeutics**, v. 3, n. 3, p. 334-346, 2002.
- PRESCOTT, J. F.; LASTRA, M.; BARKSDALE, L. Equi factors in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 988-990, 1982.
- PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 20-34, 1991.
- PRESCOTT, F. J.; PATTERSON, C. M.; NICHOLSON, M. V.; MOREIN, B.; YAGER, A. J. Assessment of the immunogenic potential of *Rhodococcus equi* virulence associated protein (VapA) in mice. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 213-225, 1997.
- PRINCE, A. M.; WHALEN, R.; BROTMAN, B. Successful nucleic acid based immunization of newborn chimpanzees against hepatitis B virus. **Vaccine**, v. 15, n. 8, p. 916-919, 1997.
- RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 478-482, 1997.
- RAHMAN, M. J.; FERNÁNDEZ, C. Neonatal vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG: Potential effects as a priming agent shown in a heterologous prime-boost immunization protocol. **Vaccine**, v. 27, n. 30, p. 4038-4046, 2009.
- REN, J.; PRESCOTT, J. F. Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 167-182, 2003.
- REN, J.; PRESCOTT, J. F. The effect of mutation on *Rhodococcus equi* virulence plasmid gene expression and mouse virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 103, n. 3-4, p. 219-230, 2004.
- RIBEIRO, M. G.; NARDI JUNIOR, G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; GONÇALVES, R. C.; SILVA JUNIOR, F. F. Polissinovite auto-imune por *Rhodococcus equi* em potro, secundária a enterocolite. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v. 5, n. 2, p. 206-214, 2002.

- RIBEIRO, M. G.; SEKI, I.; YAKSUOKA, K.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 28, n. 1, p. 53-61, 2005.
- RODRIGUEZ-LAZARO, D.; LEWIS, D. A., OCAMPO-SOSA, A. A ; FOGARTY, U.; MAKRAI, L.; NAVAS, J.; SCORTTI, M.; HERNANDEZ, M; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. Internally controlled real-time PCR method for quantitative species-specific detection and vapA genotyping of *Rhodococcus equi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4256-4263, 2006.
- ROLAND, K. L.; TINGE, S. A.; KILLEEN, K. P.; KOCHI, S. K. Recent advances in the development of live attenuated bacterial vectors. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 62-72, 2005.
- ROSENFELD, G. Corante pancrônico para hemaologia e citologia clinica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memoriais do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.
- RUKAVINA, D.; PODACK, E. R. Abundant perforin expression at the maternal-fetal interface: guarding the semiallogeneic transplant? **Immunology Today**, v. 21, n. 4, p. 160-163, 2000.
- RUSSELL, D. A.; BYRNE, G. A.; O'CONNELL, E. P.; BOLAND, C. A.; MEIJER, W. G. The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene vapA of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 17, p. 5576-5584, 2004.
- SHATA, M. T.; STEVCEVA, L.; AGWALE, S.; LEWIS, G. K.; HONE, D. M. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. **Molecular Medicine Today**, v. 6, n. 2, p. 66-71, 2000.
- SHEORAN, A. S.; TIMONEY, J. F.; HOLMES, M. A.; KARZENSKI, S. S.; CRISMAN, M. V. Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 9, p.1099-1105, 2000.
- SIEGRIST, C. A. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, S4-S9, p. 4-9, 2007.
- SLOVIS, N. M. What's news. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 9, p. 369-370, 2004.
- SMITH, B. P.; JANG, S. S. Isolation of *Corynebacterium equi* from a foal with an ulcerated leg wound and a pectoral abscess. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 177, n. 7, p. 623-624, 1980.
- SMOLEN, K. K.; LOEFFLER, D. I. M.; REIKIE, B. A.; APLIN, L.; CAI, B.; FORTUNO III, E. S.; KOLLMANN T. R. Neonatal immunization with *Listeria monocytogenes*

Referências

induces T cells with an adult-like avidity, sensitivity, and TCR-V(repertoire, and does not adversely impact the response to boosting. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2010.

SOBOLL, G.; HUSSEY, S. B.; WHALLEY, J. M.; ALLEN, G. P.; KOEN, M. T.; SANTUCCI, N.; FRASER, D. G.; MACKLIN, M. D.; SWAIN, W. F.; LUNN, D. P. Antibody and cellular immune responses following DNA vaccination and EHV-1 infection of ponies. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 111, n. 1-2, p. 81-95, 2006.

SPEERT, D. P. Macrophages in bacterial infection. In: LEWIS C. E.; McGEE, J. O. **The macrophage**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 215- 263.

SWIDERSKI, C. E.; KLEI, T.; POURCIAU, S.; CHAPMAN, M. R.; MOORE, R.; MCCLURE, J. R.; HOROHOV, D. W. T cell cytokine responses to *Strongylus vulgaris* in infected and vaccinated ponies. In: WERNERY, U.; WADE, J. F.; MUMFORD, J. A.; KAADEN, O. R. **Equine infectious diseases**. R & W Publications: Newmarket, 1998. p. 206-210.

SYDOR, T.; VON BARGEN, K.; BECKEN, U.; SPUERCK, S.; NICHOLSON, V. M.; PRESCOTT, J. F.; HAAS, A. A mycolyl transferase mutant of *Rhodococcus equi* lacking capsule integrity is fully virulent. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 3-4, p. 327-341, 2007.

TAKAI, S.; ANZAI, T.; FUJITA, Y.; AKITA, O.; SHODA, M.; TSUBAKI, S.; WADA, R. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20 kDa protein (VapB) in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 71-80, 2000.

TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p.167-76, 1997.

TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; KAMISAWA, K.; IMAI, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. **Microbiology and Immunology**, v. 40, n. 8, p. 591-594, 1996.

TAKAI, S.; IIMORI, S.; TSUBAKI, S. Quantitative fecal culture for early diagnosis of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* enteritis in foals. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 4, p.479-484, 1986.

TAKAI, S.; KOIKE, K.; OHBUSHI, S.; IZUMI, C.; TSUBAKI, S. Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p.439-443. 1991a.

TAKAI, S.; MADAREME, H.; MATSUMOTO, C.; INOUE, M.; SASAKI, Y.; HASEGAWA, Y.; TSUBAKI, S.; NAKANE, A. Pathogenesis of *Rhodococcus equi* infection in mice: roles of virulence plasmids and granulogenic activity of bacteria. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 1995.

Referências

- TAKAI, S.; SASAKI, Y.; IKEDA, T.; UCHIDA, Y.; TSUBAK, S.; SEKIZAKI, T. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 457-460, 1994.
- TAKAI, S.; SEKIZAKI, T.; OZAWA, T.; SUGAWARA, T.; WATANABE, Y.; TSUBAKI, S. Association between a large plasmid and 15-to-17 kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 11, p. 4056-4060, 1991b.
- TAN, C.; PRESCOTT, J. F.; PATTERSON, M. C.; NICHOLSON, V. M. Molecular characterization of a lipid-modified virulence associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 51-59, 1995.
- TAOUJI, S.; NOMURA, I.; GIGUERE, S.; TOMOMITSU, S.; KAKUDA, T.; GANNE, V.; TAKAI, S. Immunogenicity of synthetic peptides representing linear B-cell epitopes of VapA of *Rhodococcus equi*. **Vaccine**, v. 22, n. 9-10, p. 1114-1123, 2004.
- THAMM, D. H.; KURZMAN, I. D.; KING, I.; LI, Z.; SZNOL, M.; DUBIELZIG, R. R.; VAIL, D. M.; MACEWEN, E. G. Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting *Salmonella typhimurium* to dogs with spontaneous neoplasia: phase I evaluation. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 13, p. 4827-4834, 2005.
- TIZARD, I. R. Dendritic cells and antigen processing. In:_____. **Veterinary immunology: an introduction**, 8. ed. Philadelphia: Saunders, 2008. p. 89-100.
- TKACHUK-SAAD, O.; PRESCOTT, J. *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2696-2700, 1991.
- TOYOOKA, K.; TAKAI, S.; KIRIKAE, T. *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1007-1015, 2005.
- VANNIASINKAM, T.; BARTON, M. D.; HEUZENROEDER, M. W. The immunogenicity of *Rhodococcus equi* GroEL2-based vaccines in a murine model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, n. 1-2, p. 91-100, 2003.
- VARGA, J.; FODOR, L.; RUSVAI, M.; SOÓS, I.; MAKRAI, L. Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 205-212, 1997.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; PRESCOTT, J. F.; MEIJER, W. G.; LEADON, D. P.; HINES, S. A. Havemeyer workshop report: *Rhodococcus equi* comes of age. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 93-95, 2009.
- VEKEMANS, J.; AMEDEI, A.; OTA, M. O.; D'ELIOS, M. M.; GOETGHEBUER, T.; ISMAILI, J.; NEWPORT, M. J.; DEL PRETE, G.; GOLDMAN, M.; MCADAM, K. P.; MARCHANT, A. Neonatal bacillus Calmette-Guerin vaccination induces adult-like

---

Referências

- IFN-gamma production by CD4 T lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 5, p. 1531-1535, 2001.
- VELILLA, P. A.; RUGELES, M. T.; CHOUGNET, C. A. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. **Clinical Immunology**, v. 121, n. 3, p. 251-259, 2006.
- VENNER, M.; REINHOLD, B.; BEYERBACH, M.; FEIGE, K. Efficacy of azithromycin in preventing pulmonary abscesses in foals. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 301-303, 2009.
- VON BARGEN, K.; HAAS, A. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 12, p. 870-891, 2009.
- VON BARGEN, K.; MARCO POLIDORI, M.; BECKEN, U.; HUTH, G.; JOHN F. PRESCOTT, J. F.; HAAS, A. *Rhodococcus equi* Virulence-Associated Protein A is required for diversion of phagosome biogenesis but not for cytotoxicity. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5676-5681, 2009.
- VOTAVA, M.; SKALKA, B.; TEJKALOVA, R. *Rhodococcus equi* - a newly recognized opportunistic pathogen in man. **Epidemiologie Mikrobiologie Immunologie**, v. 46, n. 2, p. 58-66, 1997.
- WALL, D. M.; DUFFY, P. S.; DUPONT, C.; PRESCOTT, J. F.; MEIJER, W. G. Isocitrate lyase activity is required for virulence of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6736-6741, 2005.
- WANG, Q. L.; PAN, Q.; MA, Y.; WANG, K.; SUN, P.; LIU, S.; ZHANG, X. L. An attenuated Salmonella-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 27, n. 48, p. 6712-6722, 2009.
- WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Biodirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, 1993.
- WEINSTOCK, D. M.; BROWN, A. E. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. **Clinical Infectious Disease**, v. 34, n. 10, p. 1379-1385, 2002.
- WILSON, D. W. Foal Pneumonia. In: ROBINSON, E. N. **Current therapy in equine medicine**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997. p. 612-619.
- YAGER, J. A. The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 225-232, 1987.
- ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; PRESCOTT, J. F.; FERNANDO, M. A. Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 295-305, 1987.

Referências

ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; SMART, N. L. *Corynebacterium equi* infections in horse, 1958-1984: a review of 131 cases. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 27, n. 5, p. 213-217, 1986.

Apêndices**APÊNDICE A - Valores hematológicos de referência (Knottenbelt, 2004 *modificado*).**

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1 dia	32-46	10-13	12-16	5000-12000	3500-10000	1200-2200	50-500	---	100-400
7 dias	28-44	9-13	10-16	6000-13000	6000-12000	1500-3000	50-500	0-200	150-450
> 7 dias	32-52	6-12	10-19	5500-12500	2700-6700	1500-5500	0-800	0-900	200-700

APÊNDICE B – Presença de fibrina e aderências no pulmão e diafragma do potro pyA4 da primeira etapa experimental

---

APÊNDICE C – Peritonite no potro pyA5 da primeira etapa experimental

Apêndices**APÊNDICE D – Tabelas 13 a 19: Resultado dos hemogramas dos animais da primeira etapa experimental**

Tabela 13 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA1. Pirassununga, 2008

<i>Dia de vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g/dL	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	37	9.5	12.9	10800	7992	2736	432	0	200
7	34	8.2	11.1	10400	7800	2392	104	0	400
14	36	7.8	10.8	9200	5980	2760	368	92	400
21	35	8.4	9.9	9000	6300	2160	360	180	400
28	34	7.4	11.5	11200	8288	1792	784	112	600
35	34	9.0	12.7	16200	11988	3240	648	364	400
42	34	8.4	11.2	14200	8946	3692	994	284	600
49	34	7.4	11.1	10500	7665	1785	945	105	800
56	31	6.5	10.4	12000	8760	2040	840	360	600
63	35	8.4	11.7	9400	5828	2914	564	94	800

Tabela 14 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA2. Pirassununga, 2008

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	50	8.1	13.8	9000	5940	2250	270	0	200
7	40	8.7	14.0	5.800	4176	1218	348	58	400
14	38	8.0	12.0	20600	16564	2472	1236	0	200
21	36	7.8	11.5	12800	9344	2816	1152	0	400
28	32	5.6	12.7	8800	5456	2640	528	176	600
35	33	8.7	12.3	9300	4371	4278	651	0	400
42	33	8.6	10.1	8600	3380	1092	624	104	400
49	33	6.6	10.9	9000	6390	900	600	0	200
56	31	7.3	7.3	8100	4293	3488	324	0	400
63	31	7.8	10.8	10600	7844	2014	636	106	400

Apêndices

Tabela 15 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA3. Pirassununga, 2008

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	39	8.5	12.7	8700	6090	2349	261	0	400
7	32	7.0	12.1	11400	7866	2622	912	0	400
14	31	7.6	10.0	10700	7597	2782	214	107	400
21	32	8.6	12.6	10400	6864	2704	832	0	400
28	28	7.2	8.7	10600	5936	3710	742	0	400
35	33	5.4	9.9	34900	26524	5584	2094	0	800
42	32	8.6	10.1	33400	30006	2004	1002	334	800
49	26	6.5	6.3	24600	20418	2706	1476	0	400
56	27	6.5	8.7	17600	13904	3168	528	0	600
63	27	6.7	9.5	17800	14062	2670	1068	0	600

Tabela 16 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA4. Pirassununga, 2008

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	37	8.3	11.4	8400	6972	1260	168	0	200
7	34	7.7	10.8	6500	4680	1365	390	65	200
14	33	6.7	10.8	9900	7623	1683	594	0	400
21	32	6.5	10.4	6900	5520	828	483	0	400
28	28	6.4	9.2	5000	4150	500	350	0	800
35	29	5.1	11.2	12500	9250	1750	1375	125	800
42	29	5.8	9.0	21700	16492	3472	1736	0	600
49	30	6.7	10.0	10500	7980	2100	315	105	800
56	31	6.5	10.1	6800	6800	2700	200	300	600
63	33	8.6	10.6	10200	7854	2142	102	102	1000

Apêndices

Tabela 17 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA5. Pirassununga, 2008

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. $\times 10^6/\mu\text{L}$	Hemogl. g%	Leucóci. $/\mu\text{L}$	Neutrófi. $/\mu\text{L}$	Linfóci. $/\mu\text{L}$	Monóci. $/\mu\text{L}$	Eosinófi. $/\mu\text{L}$	Fibrinog. $/\mu\text{L}$
1	43	9.8	15.0	9100	8099	819	182	0	200
7	39	8.6	12.2	8100	5751	1863	486	0	200
14	38	9.1	12.3	8100	5751	1701	567	81	600
21	33	7.3	10.7	12000	7560	2760	1560	120	400
28	34	8.3	11.3	14000	9240	3640	840	0	600
35	32	8.9	10.1	16600	10790	4150	149	16	800
42	31	7.7	9.8	17500	11025	5600	875	0	600
49	35	8.1	10.7	13400	8308	4556	536	0	600
56	35	8.65	10.8	14400	10512	3744	144	0	800
63	36	8.8	11.8	16200	11340	4374	486	0	600

Tabela 18 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA1. Pirassununga, 2008

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. $\times 10^6/\mu\text{L}$	Hemogl. g%	Leucóci. $/\mu\text{L}$	Neutrófi. $/\mu\text{L}$	Linfóci. $/\mu\text{L}$	Monóci. $/\mu\text{L}$	Eosinófi. $/\mu\text{L}$	Fibrinog. mg/dL
1	39	9.0	14.0	8800	7216	1144	440	0	400
7	34	8.0	12.3	4900	3234	1274	294	98	600
14	32	7.7	9.6	6600	4026	2046	462	66	400
21	33	8.0	11.5	8600	6192	2062	172	172	400
28	31	6.8	10.2	9300	6882	1674	744	0	600
35	35	8.4	12.5	12900	10062	2193	645	0	400
42	35	7.5	9.0	8100	5994	1134	891	81	400
49	34	7.2	10.6	6700	4891	1407	335	67	400
56	43	7.7	12.8	8700	5220	2871	609	0	200
63	34	7.8	11.0	7400	5476	1406	444	74	400

Apêndices

Tabela 19 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA2. Pirassununga, 2008

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	51	9.6	16.4	9200	7452	1196	546	0	200
7	33	6.1	13.3	6200	4402	1426	186	186	200
14	35	7.3	11.0	7800	4680	2730	390	0	400
21	30	6.0	9.5	6600	4752	990	330	0	600
28	33	7.6	12.2	6000	3900	1620	480	0	200
35	35	7.7	11.4	8000	7360	1680	560	80	400
42	35	9.8	12.9	5700	3990	684	912	114	400
49	29	7.1	9.0	4600	2990	920	552	46	600
56	29	7.5	9.0	6700	4757	1474	268	201	600
63	30	7.7	10.1	9800	6664	2548	588	196	600

APÊNDICE E: Feto abortado (animal pyA 4 da segunda etapa experimental)

Apêndices

APÊNDICE F: Lesões compatíveis com enterite hemorrágica na necropsia do animal pyA 5 da segunda etapa experimental

Apêndices**APÊNDICE G – Tabelas 20 a 27: Resultado dos hemogramas dos animais da segunda etapa experimental**

Tabela 20 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA1. Pirassununga, 2009

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	40	8.55	12.4	9400	7614	1410	376	0	400
7	35	8.97	11.4	8000	5920	1680	320	80	600
14	34	7.77	10.8	5900	4720	1062	118	0	400
21	32	8.42	10.2	5500	2970	2420	110	0	800
28	32	7.75	10.3	13800	10074	2760	828	0	800
35	32	7.85	10.2	20000	14800	3000	1800	400	1400
42	33	8.20	10.5	10.800	7884	1944	864	108	800
49	35	8.10	11.0	11500	8510	2530	230	230	600
56	33	7.65	10	11200	9184	1344	672	0	600
63	35	8.22	11.3	8400	5712	2268	336	84	600

Tabela 21- Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA2. Pirassununga, 2009

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	40	8.65	13.1	10300	8343	1751	206	0	400
7	37	9.25	12.0	10900	8611	2071	218	0	400
14	34	8.10	10.5	7000	4760	2030	140	70	400
21	35	8.47	11.0	7800	6318	1248	156	78	600
28	31	6.80	10.2	6800	4420	2108	204	68	600
35	29	7.05	9.2	16500	13530	2475	495	0	600
42	30	6.50	9.3	22600	19210	2260	904	226	200
49	33	7.62	10.7	21900	18834	1971	876	219	400
56	30	7.05	9.8	17400	14616	2436	348	0	600
63	29	7.55	9.6	13500	9990	2835	270	270	400

Apêndices

Tabela 22 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA3. Pirassununga, 2009

<i>Dia de vida</i>	Hemat.	Hemác.	Hemogl.	Leucóci.	Neutrófi.	Linfóci.	Monóci.	Eosinófi.	Fibrinog.
	%	x10⁶/μL	g/dL	/μL	/μL	/μL	/μL	/μL	mg/dL
1	40	8.2	13.1	7800	6162	1248	390	0	400
7	40	8.7	12.8	13900	10703	2363	556	139	400
14	38	9.12	12.3	11200	8624	2240	224	0	600
21	34	7.45	11.2	8500	6205	2125	170	0	600
28	30	6.6	10	5400	4374	918	54	54	600
35	32	7.25	10.3	26800	20636	5092	804	268	800
42	27	5.75	8.8	26500	20935	4505	1060	0	600
49	30	7.05	9.5	18300	14640	3294	366	0	1000
56	25	5.8	8.0	16900	13351	2704	676	169	600
63	25	6.72	8.1	8100	4941	2754	243	162	600

Tabela 23 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA4. Pirassununga, 2009

<i>Dia de Vida</i>	Hemat.	Hemác.	Hemogl.	Leucóci.	Neutrófi.	Linfóci.	Monóci.	Eosinófi.	Fibrinog.
	%	x10⁶/μL	g%	/μL	/μL	/μL	/μL	/μL	mg/dL
1	42	8.65	13.5	5500	3960	1375	165	0	400
7	40	7.80	13	10500	8400	1680	420	0	400
14	33	7.35	10.7	12200	10126	1342	732	0	600
21	31	6.85	10.1	7700	6006	1078	539	77	800
28	32	7.50	10.5	7900	5846	1738	237	79	800
35	28	6.3	9	9800	6468	2254	1078	0	800
42	27	6.55	8.9	9100	6097	2093	728	91	1000
49	29	6.17	9.6	9300	6696	2325	279	0	600
56	31	7.8	10	4600	2806	1472	322	0	800
63	31	7.3	10	4900	2989	1715	147	0	1000

Apêndices

Tabela 24 - Resultado dos hemogramas realizados no animal vapA5. Pirassununga, 2009

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	42	9.75	12.9	12600	10458	1890	252	0	200
7	40	9.47	13.0	8600	6106	2064	430	0	800
14	38	7.85	11.5	5500	2805	2090	550	55	1200
21	35	7.25	10.6	5000	3550	1200	250	0	800
28	35	7.95	10.5	6400	3776	2496	128	0	600
35	32	7.30	10.1	5800	4814	754	232	0	600
42	35	7.35	10.9	10000	7900	1600	500	0	600
49	31	7.40	10.2	22300	18955	2899	446	0	800
56	32	6.80	10.1	21000	17220	2520	1260	0	1200
63	28	6.50	9.20	28000	21760	3840	1920	480	1400

Tabela 25 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA1. Pirassununga, 2009

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. x10⁶/μL	Hemogl. g%	Leucóci. /μL	Neutrófi. /μL	Linfóci. /μL	Monóci. /μL	Eosinófi. /μL	Fibrinog. mg/dL
1	41	8.40	12.5	9100	7189	1729	182	0	600
7	42	9.55	13.6	6000	3600	1800	540	60	600
14	35	8.32	10.7	32500	26975	3900	1625	0	1000
21	29	7.15	9.0	14200	11502	1846	852	0	1200
28	26	5.40	8.2	9300	7068	1488	744	0	1200
35	27	5.85	8.3	13500	10800	2160	540	0	1000

Apêndices

Tabela 26 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA2. Pirassununga, 2009

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. $\times 10^6/\mu\text{L}$	Hemogl. g%	Leucóci. $/\mu\text{L}$	Neutrófi. $/\mu\text{L}$	Linfóci. $/\mu\text{L}$	Monóci. $/\mu\text{L}$	Eosinófi. $/\mu\text{L}$	Fibrinog. mg/dL
1	41	9.10	13	10800	8748	1512	540	0	200
7	43	11	14	14800	10288	3572	564	376	400
14	39	9.65	12.4	9300	6510	2511	186	93	600
21	32	8.5	10.4	13000	9360	2990	520	130	400
28	34	8.25	10.9	8100	5427	2106	567	0	1200
35	30	7.05	9.6	14400	10944	1728	1728	0	1000
42	32	7.8	10	16700	13026	2505	1169	0	800

Tabela 27 - Resultado dos hemogramas realizados no animal pyA3. Pirassununga, 2009

<i>Dia de Vida</i>	Hemat. %	Hemác. $\times 10^6/\mu\text{L}$	Hemogl. g%	Leucóci. $/\mu\text{L}$	Neutrófi. $/\mu\text{L}$	Linfóci. $/\mu\text{L}$	Monóci. $/\mu\text{L}$	Eosinófi. $/\mu\text{L}$	Fibrinog. mg/dL
1	44	10.05	13.5	9300	6045	3096	93	93	800
7	40	9.65	12.6	15400	11396	3542	308	0	400
14	28	7.65	9.3	7500	3975	2850	675	0	800
21	33	7.17	10.5	13000	9880	1820	1300	0	800
28	32	7.25	9.9	23100	18942	3003	924	231	800
35	31	7.75	9.7	24700	20254	247	988	247	800
42	29	7.70	9.0	10000	7100	2000	800	100	600
49	28	6.80	9.4	8000	5840	1840	320	0	800
56	30	7.15	9.6	10700	8346	2033	107	214	600
63	29	7.10	9.5	7100	5183	1846	71	0	800