BARBARA GABRIELA SOARES SANCHES

Avaliação da função fagocítica de células da linhagem
monócitos-macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da
artrite-encefalite caprina, à *Corynebacterium pseudotuberculosis*

São Paulo

2008

BARBARA GABRIELA SOARES SANCHES

Avaliação da função fagocítica de células da linhagem
monócitos-macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da artrite-
encefalite caprina, à *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

São Paulo

2008

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

conf. ficha cat. sf
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
16/7/08

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2015
FMVZ

Sanches, Barbara Gabriela Soares

Avaliação da função fagocítica de células da linhagem monócitos-macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da artrite-encefalite caprina, à *Corynebacterium pseudotuberculosis* / Barbara Gabriela Soares Sanches. – São Paulo : B. G. S. Sanches, 2008.
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2008.

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

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Artrite encefalite caprina a vírus. 2. Linfadenite caseosa. 3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 4. Fagocitose. 5. Macrófagos. 6. Caprinos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da resposta inata de caprinos naturalmente infectados com o vírus da artrite-encefalite caprina à *Corynebacterium pseudotuberculosis*", protocolado sob o nº1229/2007, utilizando 12 (doze) cabras, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, 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 em reunião de 21/11/07.

We certify that the Research "Assesment of innate response of caprines naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus to *Corynebacterium pseudotuberculosis*", protocol number 1229/2007, utilizing 12 (twelve) goats, under the responsibility Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANCHES, Barbara Gabriela Soares

Título: Avaliação da função fagocítica de células da linhagem monócitos-macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da artrite-encefalite caprina, à *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai (*in memoriam*) um homem singular... Inteligente, íntegro, bondoso e um grande educador. Apaixonado pela família, pela profissão e pela vida. Que me ensinou que tudo na vida depende de nós, das nossas batalhas. Sem dúvida, a pessoa que mais admirei nessa minha jornada e que partiu sem me ouvir dizer o quanto o amava e o quanto o admirava. Meu eterno agradecimento à você pai, por tudo que me ensinou, apoiou e me ajudou a concretizar, pois, sem dúvida, sem você, eu não chegaria onde cheguei!

À minha “pequena” grande família.

Ao Ari, que sempre me motivou não me deixando desistir dos sonhos, mostrando-me o quanto o mundo é maravilhoso através da sua dedicação, carinho e amor.

À minha filha Ullly que entendeu minha ausência como mais uma conquista.

Sem dúvida não teria alcançado essa vitória sem o estímulo e carinho que desprenderam por mim. Meu eterno muito obrigada!!!! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Para realização dessa pós-graduação, muitas pessoas foram fundamentais, pois, colaboraram de diferentes formas, quer com uma palavra amiga na hora exata, quer com algum conhecimento técnico passado, mas, sem dúvida, a união de tudo me impulsionou para mais essa etapa vencida. Seria impossível citar todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para esse crescimento, portanto, segue abaixo as principais.

A toda minha família, meu porto seguro, que me apóia em cada passo da vida, sempre acreditando no meu crescimento como pessoa e como profissional e que com palavras sábias na hora certa, não medem esforços em torcer pela minha vitória. Meu muito obrigada – amo vocês!!!

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Alice Maria Melville Paiva Della Libera, pessoa maravilhosa, única, de uma grandeza de espírito e sabedoria, excelente profissional e acima de tudo educadora, que confiou no meu trabalho dando-me a oportunidade e a honra de tê-la como orientadora; que me ensinou muitas lições profissionais, mas, acima de tudo, me ensinou muito sobre a vida. Muito Obrigada!!!!

À grande amiga Elisa Rossi Komninou, que me pegou pelas mãos na hora de desespero, pacientemente me ouviu e ajudou-me a encontrar a estrada certa... A dívida que tenho é impagável, portanto, registro aqui minha eterna gratidão.

Ao meu querido irmão Daniel Soares Sanches, médico veterinário e também pós graduando, que sempre esteve ao meu lado com seu ombro amigo e seu sorriso lindo, sempre com palavras ternas que me deram muita força para seguir em frente.

Em especial, ao médico veterinário Fernando Nogueira Souza, membro da equipe de pesquisa, que além de ter me dado a honra de tê-lo como profissional, me dá a honra de tê-lo como amigo. Sempre serei grata pelo tempo despendido em me auxiliar pelo caminho que tracei. Meu eterno muito obrigada.

À nossa equipe de pesquisa formada pelos médicos veterinários Milton Ricardo Azedo, Maiara Garcia Blagitz e Tatiana de Rezende Spínola, companheiros de trabalho, mas grandes amigos, cada um com uma particularidade que os tornam pessoas especiais e muito queridas, sem vocês seria impossível... Agradeço de todo coração!!!!

Às médicas veterinárias Camila Freitas Batista e Luciana Parra, que de alguma forma foram essenciais para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa e que despendem meu carinho especial. Obrigada!

À grande amiga Sandra Satiko Kitamura pela grande ajuda nas várias etapas desse trabalho e pela sincera e fiel amizade.

À Cláudia Regina Stricagnolo, técnica do laboratório de Imunologia do Departamento de Clínica Médica da FMVZ – SP, que participou ativamente da realização desse projeto, sempre sorrindo e brincando e ao término se demonstrou uma pessoa maravilhosa, tornando-se uma grande amiga. Obrigada!

Às técnicas dos laboratórios, do Departamento de Clínica Médica da FMVZ – SP, Samantha, Clara, Marli, Maria Helena, Carmem, Dinha e Maú que muito me ajudaram na padronização da técnica e durante todo o experimento, que auxiliaram no meu treinamento, demonstrando sempre muito boa vontade. Obrigada!

Às secretárias do Departamento de Clínica Veterinária Adelaide e Cida, pela ajuda desprendida e pela agradável convivência.

Aos funcionários da biblioteca, sem exceção, que me ajudaram muito e sempre com muito bom humor e carinho, tornando este lugar especial. Obrigada!!!!

Ao Professor Dr. Nilson Roberti Benites pessoa ímpar e polêmica, que me mostrou uma visão diferente sobre alguns aspectos acadêmicos e pessoais da vida, que me ensinou a questionar e por fim, que ofereceu grande ajuda com a parte microbiológica deste trabalho. Meu muito obrigada e minha grande admiração!

À querida Dra. Priscilla Anne Melville, sempre sorridente, profissional maravilhosa, que juntamente com o Professor Nilson, não mediu esforços para ajudar na parte microbiológica e que foi imprescindível no meu processo de formação. Muitíssimo obrigada!!!!

À Professora Dra. Maria Cláudia Araripe Sucupira, pessoa forte e de caráter impecável, a qual tenho muito carinho, pelas longas conversas, que foram fundamentais ao meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Professor Dr. Fernando José Benesi, pessoa apaixonante a qual me desprendeu grande carinho, agradeço pelas conversas que muito me acrescentaram nesse trabalho, mas, acima de tudo, muito me acrescentaram à vida.

Ao Professor Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, pelas idéias e conhecimentos passados durante o período desse mestrado, fundamentais nesse projeto e à minha formação e capacitação profissional.

Ao Professor Dr. Wilson Roberto Fernandes, pessoa que sempre admirei, e que muito me ajudou num período de dificuldades.

À Professora Dra. Lilian Gregory que despendeu seu tempo a nos auxiliar durante a fase de escolha de tema e padronização de técnica, com muito humor. Obrigada!

Ao professor Archivaldo Reche Júnior pela colaboração e pelos agradáveis momentos.

Ao professor Wanderley Pereira de Araújo, pessoa querida, pela agradável convivência e troca de informações.

Aos pós graduandos da clínica médica e amigos Rebeca Weigel, Fernanda Cyrillo, Humberto Hammad, Thales dos Anjos de Faria Vechiato e Karin Kieling pelas longas conversas que geraram trocas de experiência e troca de conhecimento e, que sem dúvida, acrescentaram muito. Obrigada a cada um de vocês!!!!

À todos os funcionários dessa Universidade, mas, principalmente, aos da Faculdade de Medicina Veterinária, secretárias, técnicas de laboratório, tratadores e seguranças, sempre muito simpáticos, prestativos e abertos às novas pessoas que chegam. Minha grande admiração, carinho e respeito por todos vocês, sem exceção.

Finalmente, aos amigos Mônica Fiorellini, José Fernando Nogueira, Madalena Yoshiko Isoda, Ivan Duarte Nogueira, José e Márcia Aly, Heitor Pinheiro, Laércio Chiarinni, Luzia de Oliveira, que contribuíram imensamente para meu aprimoramento pessoal.

“Sonhe aquilo que você quiser.

Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida

E nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.

Tenha Felicidade bastante para fazê-la doce, dificuldades para fazê-la forte,

Tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas, elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram, para aqueles que se machucam, para aqueles que buscam e tentam sempre e para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido.

Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado.

A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

SANCHES, B. G. S. **Avaliação da função fagocítica de células da linhagem monócitos-macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da artrite-encefalite caprina, à *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** [Evaluation of Phagocytosis Function of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Goats naturally infected with Caprine Arthritis-Encephalitis Virus]. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Para avaliar a fagocitose de células da série monócitos-macrófagos de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina a vírus (VAEC), 30 cabras da raça Saanen foram utilizadas e alocadas em dois grupos distintos, sendo um grupo formado por 15 animais soropositivos à imunodifusão em gel de ágar para detecção de anticorpos séricos antivírus da AEC e o outro formado por 15 animais soronegativos ao teste. Células mononucleares de sangue periférico foram isoladas por gradiente de concentração e plaqueadas em placas de poliestireno para isolamento de células da série monócito-macrófago. Após adesão das mesmas, adicionou-se a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* como desafio antigênico. Dois tipos de fagocitose foram observados em relação ao número de bactérias internalizadas nos vacúolos citoplasmáticos dos macrófagos, isto é, verificou-se a presença de células fagocitando em média 12 bactérias e outro grupo fagocitando um número incontável de bactérias. Dessa forma, classificou-se a fagocitose em fagocitose + (até 12 bactérias) e fagocitose ++ (mais de 12 bactérias). Em relação à fagocitose total (fagocitose + e fagocitose ++) não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,41$). Todavia, ao discriminar a fagocitose conforme a quantificação de bactérias fagocitadas, encontrou-se diferença estatística entre os grupos, sendo que o grupo positivo apresentou maior porcentagem de fagocitose ++ ($p < 0,001$). O grupo negativo apresentou maior porcentagem de fagocitose + ($p < 0,012$). Correlação positiva entre monócitos fagocitando e fagocitose ++ foi observada no grupo de animais soropositivos ($p < 0,006$), porém, não foi observada nenhuma correlação no grupo negativo ($p < 0,49$). Esses resultados demonstram uma possível alteração na intensidade da fagocitose de macrófagos de animais

infectados com o VAEC, sugerindo que os animais com artrite encefalite caprina estejam mais susceptíveis à linfadenite caseosa.

Palavras-chave: Artrite encefalite caprina a vírus. Linfadenite caseosa. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Fagocitose. Macrófagos. Caprinos.

ABSTRACT

SANCHES, B. G. S. **Evaluation of Phagocytosis Function of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Goats naturally infected with Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus.** [Avaliação da função fagocítica de células da linhagem monócitos-macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da artrite-encefalite caprina, à *Corynebacterium pseudotuberculosis*]. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

To evaluate the phagocytosis from monocyte-macrophage line cells 30 naturally infected Saanen goats with caprine arthritis-encephalitis vírus (VCAE) were used, and divided uniformly in different groups according to agar gel immunodiffusion test (AGID). Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) was isolated by density gradient centrifugation. The monocyte-macrophage cells were separated from PBMC by their adherence properties. Afterwards, the phagocytosis function was assessed by phagocytosis assay using *Corynebacterium pseudotuberculosis* as a source of antigen. Therefore, two distinct types of phagocytosis were observed and were set according to the number of bacteria within the cytoplasmatic vacuoles. Thus, the phagocytosis rates were also divided in two groups, on the first was observed up to 12 bacteria in the vacuoles; on the other hand in the second group an uncountable number of bacteria were usually seen. Consequently, the phagocytosis rates were also divided in phagocytosis + (up to 12 bacteria) and phagocytosis ++ (more than 12 bacteria). The results from the phagocytosis rates show any difference, however when the phagocytosis rates were separated in the order of the number of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phagocytosed, the phagocytosis ++ from positive animals in the sera test were higher than the negative one ($p < 0.001$). Nevertheless, the negative group presents higher phagocytosis + ($p < 0.012$). Furthermore a positive and significant correlation between phagocytosis ++ and monocyte phagocytosis ($p < 0.006$) were also encountered in the positive animals, however the same were not observed in the negative group ($p < 0.49$). In face of, the results from the present trial point out to higher susceptibility to caseous lymphadenitis in goats infected with VCAE due to the alteration on the phagocytosis strength in these animals.

Key words: Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. Caseous Lymphadenitis.

Corynebacterium pseudotuberculosis. Phagocytosis. Macrophages. Caprine.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados médios da contagem de eritrócitos e leucócitos e percentual de volume globular médio, em números absolutos (média $\pm$ desvio padrão) e %, respectivamente, dos 30 animais da raça Saanen, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2008. 47
- Tabela 2 - Resultados médios e desvios padrão da contagem diferencial relativa de leucócitos sangüíneos (%) (média $\pm$ desvio padrão), de caprinos distribuídos em função do grupo experimental – São Paulo – 2008. 51
- Tabela 3 - Avaliação da fagocitose (%) *in vitro* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por células da série monócito-macrófago obtidas de amostras sangüíneas (média $\pm$ desvio padrão) de caprinos negativos ao sorodiagnóstico para o VAEC– São Paulo – 2008. 53
- Tabela 4 - Avaliação dos índices de fagocitose (%) *in vitro* discriminada em dois diferentes grupos conforme o número de partículas fagocitadas (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) por células da série monócito-macrófago (média $\pm$ desvio padrão) de caprinos da raça Saanen, separados em função do sorodiagnóstico para a AEC– São Paulo – 2008. 55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Valores de referência da contagem eritrocitária, volume globular médio e do leucograma de caprinos sadios – São Paulo, 2008.....	40
------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Resultado da imunodifusão em gel de ágar (IDAG) para o diagnóstico da artrite encefalite caprina de 80 animais da raça Saanen – São Paulo, 2008.....	46
Figura 2 –	Distribuição dos dados do volume globular (%) dos 30 caprinos da raça Saanen nos distintos grupos experimentais – São Paulo, 2008.....	48
Figura 3 –	Distribuição dos dados da contagem de eritrócitos (10^6 / ml) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo, 2008.	49
Figura 4 –	Distribuição dos dados de leucócitos (10^3 / ml) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo, 2008.	50
Figura 5 –	Distribuição dos dados da contagem absoluta das diferentes populações de leucócitos (10^3 / ml) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo, 2008.	51
Figura 6 –	Distribuição dos resultados da contagem relativa das diferentes populações de leucócitos (10^3 / ml) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo, 2008.	52
Figura 7 –	Foto micrografia de monócito de caprino aderido com citoplasma escasso e núcleo abundante.....	53
Figura 8 –	Foto micrografia de macrófago de caprino aderido com citoplasma abundante e presença de vacúolos citoplasmáticos e núcleo com cromatina frouxa.	54
Figura 9 –	Foto micrografia de macrófago espreado de caprino com formação de pseudópodos.....	54
Figura 10 –	Foto micrografia de monócito de caprino fagocitando a bactéria <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	55
Figura 11–	Foto micrografia de macrófago caprino fagocitando (+) a bactéria <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	56
Figura 12 –	Foto micrografia de macrófago caprino fagocitando (++), apresentando citoplasma abundante e vacuolizado contendo em alguns destes a bactéria <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	56
Figura 13 –	Distribuição dos dados das diferentes porcentagens de macrófagos, macrófagos que espaiaram e macrófagos que fagocitaram	

<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008.	57
Figura 14 – Distribuição dos dados das diferentes porcentagens de monócitos e monócitos que fagocitaram <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008.	57
Figura 15 – Distribuição dos dados das diferentes porcentagens de macrófagos que fagocitaram até 12 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (Fagocitose +) e macrófagos que fagocitaram mais de 12 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (Fagocitose ++) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008.	58
Figura 16 – Correlação entre a porcentagem de monócitos que fagocitaram até 12 partículas (<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>) (Fagocitose +) e macrófagos que fagocitaram mais de 12 bactérias (Fagocitose ++) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008.....	59
Figura 17 – Correlação entre a porcentagem de monócitos que fagocitaram até 12 partículas (<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>) (Fagocitose +) e macrófagos que fagocitaram mais de 12 bactérias (Fagocitose ++) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC = Artrite Encefalite Caprina à Vírus

DNA = Ácido Desoxirribonucléico

EIAV = Anemia Infecciosa Equina

ELISA = “Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay”

FIV = Vírus da Imunodeficiência Felina

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDGA = Imunodifusão em Gel de Agar

IFN- γ = Interferon gamma

IL = Interleucina

MVV = Vírus Maedi Visna

OIE = Escritório Internacional de Epizootias

PAMP = Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

RRP = Receptor de Reconhecimento Padrão

SIDA = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TLR = “Toll-like receptor”

TNF = Fator de Necrose Tumoral

VAEC = Vírus da Artrite Encefalite dos Caprinos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA	24
2.2	LINFADENITE CASEOSA	28
2.3	IMUNIDADE INATA	33
3	OBJETIVO	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	ANIMAIS EMPREGADOS	39
4.2	COLETA DE SANGUE	39
4.3	ANÁLISE HEMATOLÓGICA	40
4.4	SORODIAGNÓSTICO	41
4.5	PREPARO DA BACTÉRIA PARA ENSAIO <i>IN VITRO</i>	41
4.6	ISOLAMENTO DE MONÓCITOS.....	42
4.7	TESTE DE FAGOCITOSE	43
4.8	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS CELULARES	43
4.8.1	Monócitos aderidos	44
4.8.2	Monócitos fagocitando <i>C. pseudotuberculosis</i>.....	44
4.8.3	Macrófagos aderidos.....	44
4.8.4	Macrófagos espiados	44
4.8.5	Fagocitose +	45
4.8.6	Fagocitose ++	45
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	TRIAGEM E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	46

5.2	AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA DOS ANIMAIS AVALIADOS	47
5.3	ENSAIO DE ESPRAIAMENTO E FAGOCITOSE	52
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A arte de criar animais data à Idade Antiga, cerca de 7.000 anos antes de Cristo. No período Paleolítico (até 26.000 anos antes de Cristo) o homem primitivo e nômade observava que as sementes que caíam sobre a terra multiplicavam em poucos meses, tornando-se desnecessária a andança atrás de alimentos, ao invés disso, o homem começou a montar pequenos povoados, iniciando-se uma agricultura rudimentar. No período Neolítico (26.000 a 5.000 anos antes de Cristo) o homem começou a aprimorar a agricultura através de arados e iniciou a domesticação dos animais, tendo como retorno, além da carne, o fornecimento de leite.

A cabra, *Capra hircus*, foi um dos primeiros animais a ser domesticado pelo homem, cerca de 7.000 anos antes de Cristo, tendo como ancestrais a cabra selvagem, *Capra aegragus* ou cabra Benzoar proveniente do oriente da Ásia e encontrada até os dias atuais no Mediterrâneo e Oriente Médio, principalmente na Ilha de Creta; a *Capra falconiere* do Himalaia, e a *Capra prisca* da bacia do Mediterrâneo. A domesticação da cabra é um processo tão antigo e tão fundamental na vida e na história do ser humano, que é citada em várias fontes literárias, entre elas, a Bíblia.

Por ser um animal dócil e altamente adaptável às diferentes condições climáticas e de solo, notavelmente, sua criação difundiu-se em várias regiões do mundo, tornando seus produtos fonte de alimentação de muitos povos, como os egípcios que utilizavam-se do leite para confecção de laticínios, e os mesopotâmios, hebreus e palestinos que alimentavam-se da carne e do leite desses animais.

As diversidades regionais foram responsáveis pelo surgimento das raças caprinas, que foram melhoradas com o decorrer dos tempos, sendo na era Moderna o aparecimento de grupos reduzidos de animais resultado da ação do homem na seleção desses animais.

Atualmente a caprinocultura apresenta uma grande importância na pecuária mundial faz parte da economia da pecuária, sendo muito difundida, principalmente, nos países em desenvolvimento. A população mundial de caprinos e ovinos, segundo dados da FAO (2005), é de 1.886.980.000 cabeças; sendo que o Brasil ocupa o 16º lugar entre os rebanhos mundiais de caprinos e ovinos. Os países que ocupam os primeiros lugares são a China, com um rebanho de 183.207.008 de cabeças, a Índia com um rebanho de 120.000.000 de cabeças e o Paquistão com um rebanho de 54.700.000 cabeças.

Os resultados preliminares do censo agropecuário realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2006 apontam uma população de caprinos da ordem de 11.460.735 cabeças; sendo a região Nordeste responsável por 10.632.816 (92,78%) cabeças, a região Sul por 260.441 (2,27%) cabeças, a região Sudeste por 272.238 (2,38%) cabeças, a região Norte por 167.791 (1,46%) cabeças e a região Centro-Oeste por 127.449 (1,11%) cabeças (ANUALPEC, 2006). Ainda, segundo o censo agropecuário do IBGE, em 1975 a população caprina era da ordem de 6.709.428 cabeças, em 1985 essa população passou para 8.207.942 cabeças e em 1995 diminuiu para 6.590.646 cabeças, sendo que atualmente este valor ultrapassa 10 milhões de cabeças. Esses números mostram que a atividade sofreu oscilações nos últimos 25 anos e, ainda, que nos últimos dez anos o rebanho aumentou consideravelmente.

Dos produtos oriundos da caprinocultura o leite, a carne e a pele merecem destaque, porém, o primeiro ainda é o produto mais difundido, sendo o terceiro leite mais consumido no mundo. Não obstante, segundo a FAO, o Brasil contribui com 1,08 % com a produção mundial. Esse fato pode ser explicado pela falta de manejo e sanidade adequados ao rebanho, à falta de conhecimento sobre a fisiologia da reprodução e às exigências nutricionais requeridas por esses animais, e algumas afecções que determinam queda de produção a descarte de animais do rebanho, tornando-se dessa forma, grande prejuízo econômico diretamente ao produtor e indiretamente à economia do país.

Destarte, duas doenças infecto-contagiosas responsáveis por prejuízos econômicos merecem destaque: a artrite encefalite caprina a vírus (AEC) e a linfadenite caseosa.

A primeira é causada por um vírus da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, presente na maioria dos rebanhos brasileiros, sendo uma enfermidade enzoótica que causa artrite e leucoencefalomielite, e com menor frequência determina alterações respiratórias e da glândula mamária (QUINN et al., 2005; AL-QUDAH et al., 2006).

A segunda causada pela bactéria Gram positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um bacilo mesofílico, que produz uma exotoxina, capaz de hidrolisar a lisofosfatidilcolina e esfingomiélin, acarretando na formação de abscessos em linfonodos superficiais ou profundos; considerada uma zoonose (COSTA, 2002; DERCKSEN et al., 2000). A infecção em humanos é considerada ocasional e ocupacional de caprino e ovinocultores, bem como a profissionais ligados à criação destas espécies, podendo ser provenientes do contato direto com o material purulento dos abscessos; sendo a ingestão do leite cru uma importante forma de contágio tanto para humanos como para animais (RADOSTITIS et al., 1994; ÇETINKAYA et al., 2002).

Ambas as afecções possuem ocorrência mundial e patogenia não totalmente elucidada, dificultando com isso o sucesso dos programas de erradicação e controle; além disso, tanto a bactéria como o vírus possuem tropismo por macrófagos do hospedeiro, corroborando para a hipótese de que as duas enfermidades interferem nos mecanismos de resposta inata do hospedeiro, quiçá se estiverem associadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA A VÍRUS

A artrite encefalite caprina a vírus (AEC) é uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, de caráter insidioso e crônico; causada por um vírus da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus* (QUINN et al., 2005), que possui tropismo por células da linhagem monócito/macrófago do hospedeiro e que acomete caprinos de todas as idades, sexos e raças (LEITE et al., 2004; LARA et al., 2005).

Dentre os vírus desse gênero, pode-se citar o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) e o vírus Maedi Visna (MVV), responsáveis por causar infecções associadas à imunodeficiência que se desenvolvem lentamente durante meses ou anos (QUINN et al., 2005; RAVAZZOLO et al., 2006).

Presente em rebanhos do mundo inteiro, estudos epidemiológicos da doença têm sido conduzidos em diversos países. Desta forma, Al-Qudah et al. (2006) investigaram a epidemiologia da infecção pelo VAEC em capris da Jordânia, durante o período de um ano e concluíram que 23,2% dos rebanhos estudados eram sororreagentes, número superior quando comparado ao rebanho da Turquia que relatou 1,9% de rebanhos infectados. No México Central a prevalência do VAEC foi de 28,6% (TORRES-ACOSTA et al., 2003), na Austrália de 82% (GREWAL et al., 1986), na Itália de 38% (GUFLER et al., 2007), em Quebec, no Canadá, de 82,5% (BELANGER; LEBOEUF, 1993) e nos Estados Unidos de 73% (CUTLIP et al., 1992).

No Brasil o vírus da AEC encontra-se amplamente disseminado na população caprina e os dados da prevalência divergem de acordo com as regiões estudadas, desta forma, no Rio de Janeiro Cortez-Moreira et al. (2005) encontraram 14,1% das amostras analisadas reativas à imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e “Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay” (ELISA). No Ceará, num estudo de 130 criatórios localizados em 30 municípios, a prevalência da infecção do VAEC foi de 1% quando estudado dentro de sua totalidade, não diferindo raça e aptidão, entretanto a prevalência foi maior quando analisado apenas os

rebanhos leiteiros (4,6%), já em Pernambuco a prevalência foi de 17,6% (PINHEIRO et al., 2001) e no Estado de São Paulo foi de 29,8% (FERNANDES, 1997).

O vírus da AEC (VAEC) provoca leucoencefalomielite, principalmente observada, em animais jovens e artrite persistente, pneumonia intersticial crônica, mastite intersticial endurativa e perda de peso progressiva em animais adultos (BANKS et al., 1983; NARAYAN et al., 1985; LARA et al., 2005; AL-QUDAH et al., 2006). Em função disto, queda na produção de leite e carne, morte ou descarte de animais soropositivos do rebanho são apontados como os principais fatores no que diz respeito aos prejuízos causados por essa enfermidade (SILVA et al., 2001; LARA et al., 2005; LILENBAUM et al., 2007).

A transmissão ocorre de forma horizontal, após ingestão de leite ou colostro de cabra infectadas com o vírus (CRAWFORD; ADAMS, 1981; ADAMS et al., 1983; EAST et al., 1987), uma vez que o vírus pode ser encontrado em secreções lácteas como partículas livres ou no interior de células somáticas do leite (SMITH; SHERMAN, 1994). Em 2003 Lara et al., num estudo sobre infecção experimental com o VAEC, ao investigarem as formas de transmissão, observaram que todos os animais tatuados com equipamentos contaminados com o vírus, apresentaram soroconversão persistente, concluindo-se, portanto, que o uso indiscriminado e seriado de seringas, agulhas e tatuadores contaminados são importantes fontes de contaminação e transmissão do vírus.

Apesar de não haver relatos da doença em humanos, Tesoro-Cruz et al. (2003) encontraram anticorpos contra VAEC em crianças que tinham contato com cabras ou seus produtos (leite, queijo, etc.), mas não encontraram esses mesmos anticorpos em crianças que não mantinham contato com essa espécie animal.

O diagnóstico da AEC é baseado na detecção de anticorpos séricos antivírus da AEC, sendo o ELISA e IDGA os testes mais comumente utilizados (LARA et al., 2003; CORTEZ-MOREIRA et al., 2005; ANDRÉS et al., 2005; BRINKHOF; VAN MAANEN, 2007). Outras técnicas alternativas e mais sofisticadas como o “Western Blot” e reação em cadeia da polimerase (PCR) não apresentam uma ampla aceitação até o momento devido à complexidade do método e dificuldade na padronização (KNOWLES JR et al., 1994; CORTEZ-MOREIRA et al., 2005; QUINN et al., 2005; BRINKHOF; VAN MAANEN, 2007).

Apesar de intensos estudos, não há tratamento para AEC até o presente momento e muitos animais permanecem assintomáticos, atuando como reservatório do vírus. Dessa forma, o controle da afecção deve ser uma prática adotada através de programas de segregação. Não há vacina eficaz (QUINN et al., 2005).

A patogenia exata da AEC não está totalmente elucidada. A persistência do vírus em vários órgãos e/ou tecidos apesar de uma intensa resposta imune é característica das lentivirose (FLURI et al., 2006; RAVAZZOLO et al., 2006). Essa similaridade, do VAEC e o HIV, foi reportada por Zink et al. (1990) que descreveram que ambos os lentivírus persistem indefinidamente e replicam produtivamente em macrófagos, causando encefalomielite, pneumonia e linfadenopatia, isto se deve a um grande número de transcrição viral nesses tecidos, sugerindo que uma associação entre a expressão do gene viral e o desenvolvimento da disfunção do órgão.

VAEC e MVV, diferentemente das outras lentivirose que infectam linfócitos, possuem tropismo por células da linhagem monócitos/macrófagos e células dendríticas (GENDELMAN et al., 1986; ZINK et al., 1990; QUINN et al., 2005; FLURI et al., 2006; RAVAZZOLO et al., 2006), todavia estudos imunológicos têm mostrado que ovinos infectados com MVV em estágios terminais da doença, apresentam uma inversão das proporções de linfócitos T $CD4^+/CD8^+$ no sangue periférico e nas articulações. Desta forma, é possível que, cabras infectadas pelo VAEC possam ter a função de linfócitos T auxiliar comprometida, similarmente à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) em humanos (ZINK et al., 1990). Assim, animais com artrite quando comparados com animais assintomáticos, possuem alta carga viral e altos títulos de anticorpos (RAVAZZOLO et al., 2006) e uma provável atividade proliferativa de células T auxiliar prejudicada, acerca disto, dê-se ao fato de diminuição da produção de citocinas ou alteração no seu perfil de produção como consequência da resposta alterada de células T auxiliar, as quais desempenham papel indispensável, montando uma sólida resposta imune de células T citotóxicas e células B de memória, prejudicando-se, então, tanto a resposta celular como a resposta humoral contra o vírus (FLURI et al., 2006).

Ravazzolo et al. (2006), num estudo que mensurava a carga viral, distribuição do vírus no organismo, lesões histopatológicas e expressão de citocinas, observaram que a expressão de interferon gama ($IFN-\gamma$) variou independente da carga viral dos animais infectados com VAEC. O papel de $IFN-\gamma$ na resposta imune contra o VAEC permanece não totalmente elucidado. De alguma forma em vários modelos virais essa citocina apresenta uma função antiviral de estimulação tanto da resposta imune inata como na resposta adaptativa, por outro lado, o $IFN-\gamma$ pode ativar a transcrição viral pela ligação a elementos responsivos ao $IFN-\gamma$ presentes ao longo da cadeia terminal repetitiva do genoma do VAEC. É também bem conhecido que o $IFN-\gamma$ media a ativação viral em células infectadas latentes que pode

subseqüentemente levar ao reconhecimento e eliminação destas células pelo sistema imune (LECHNER et al., 1997).

A Interleucina (IL) 6 está altamente expressa na AEC sendo demonstrado uma co-estimulação dos linfócitos T e atuação como fator na diferenciação das células B (LECHNER et al., 1997).

IL-12 também foi observada levemente elevada, talvez por causa de uma resposta inadequada de macrófagos. Em estimulação às células T, um aumento de IL-4 sugere ser antígeno-específico não havendo correlação com a carga viral (RAVAZZOLO et al., 2006).

Estudos da replicação de VAEC em macrófagos, *in vitro*, têm mostrado que a expressão do genoma viral é dependente do estado de maturação das células, isto é, o ácido desoxirribonucleico (DNA) do vírus em monócitos não é transcrito até que as células se transformem em macrófagos, além disso a replicação viral restrita é um mecanismo que permite ao vírus passar despercebido pelas células do sistema imune por longos períodos (ZINK et al., 1990).

Lechner et al. (1997) reportaram que a mudança da resposta imune predominantemente Th1 para Th2 poderia estar relacionada com a severidade da artrite. No entanto, a expressão de citocinas presente no estudo sugeriu que a definição da resposta imune pode ser mais complexa. Pelo fato da membrana sinovial e a drenagem do linfonodo conterem células expressando IFN- γ (uma citocina típica da resposta imune Th1) durante a infecção aguda (12º dia) e em cabras com severa artrite clínica, demonstraram que cabras com artrite clínica não exibiam uma deficiência na expressão de IFN- γ em resposta ao VAEC. A expressão de mRNA local de IFN- γ dependia mais da transcrição viral do que do estágio da artrite. Entretanto estudos preliminares indicaram um aumento da expressão de IL-10 (suportando a resposta imune Th2) nos linfonodos de caprinos com artrite crônica. Não foi detectada a transcrição de IL-4 no líquido sinovial ou nos linfonodos dos animais infectados pelo VAEC. Dessa forma, considerando-se os resultados histológicos da hibridação *in situ* obtidos da membrana sinovial tornou-se difícil classificar a artrite caprina como uma doença Th1 ou Th2. Wilkerson et al. (1995) relataram que a via alternativa de apresentação de antígenos pelos macrófagos e células dendríticas predomina sobre a via clássica na perpetuação na resposta de produção de anticorpos de memória, isso ocorre, especialmente, em um meio enriquecido de anticorpos com baixos níveis de antígenos.

O papel das células da linhagem monócito-macrófago no contexto desta doença é importante, pois, é uma célula relacionada à imunidade inata e também a célula alvo do vírus. Dessa forma, Werling et al. (1993) observaram que os macrófagos oriundos de animais

infectados pelo VAEC apresentavam 50% de redução na atividade de IL-1 e 200% de aumento na atividade do fator de necrose tumoral gamma (TNF- γ).

2.2 LINFADENITE CASEOSA

A linfadenite caseosa é uma doença infecciosa crônica, que acomete os ovinos e caprinos (JOHNSON et al., 1993, MENZIES et al., 2004) e ocasionalmente bovinos e humanos (McKEAN et al., 2005). *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa, do grupo Actinomices, um bacilo Gram-positivo, curto e pleomórfico (DORELLA et al., 2006), que muitas vezes apresenta-se na forma de cocóide isolado ou formando grupamentos irregulares (QUINN et al., 2005). Esta bactéria não é esporulada, não possui cápsula e não é móvel, contudo possuem fimbrias. É uma bactéria anaeróbia facultativa e apresenta crescimento ótimo à 37 °C, com o pH 7,0 a 7,2, as colônias são pequenas, esbranquiçadas, rodeadas por zona estreita de hemólise completa (QUINN et al., 2005; DORELLA et al., 2006). É uma bactéria mesofílica e intracelular facultativa (PRESCOTT et al., 2002; MCKEAN, 2005; MEYER et al., 2005; FONTAINE et al., 2006) que se multiplica no interior de macrófagos (CHIRINO-ZÁRRAGA et al., 2006). A virulência deste patógeno está ligada aos lipídeos de sua parede celular e à produção de uma exotoxina, a fosfolipase D (PLD). Nos estágios iniciais da infecção, a fosfolipase D pode aumentar a sobrevivência e a multiplicação desta bactéria no hospedeiro (QUINN et al., 2005).

Reações bioquímicas do *Corynebacterium pseudotuberculosis* variam consideravelmente principalmente em sua habilidade de fermentar. Todas as cepas produzem ácidos, mas não gás, de algumas fontes de carbono, incluindo glicose, frutose, maltose, manose, sucrose. Um teste confiável para a identificação da bactéria é o API-BioMérieux, (Inc.LaBalme lês Grottes, France), este teste consiste em 21 testes bioquímicos e pode ser realizado em 24-48 h (DORELLA et al., 2006).

O potencial do *Corynebacterium pseudotuberculosis* de sobreviver por muitas semanas no ambiente contribui para sua disseminação no rebanho. A transmissão entre ovinos ou caprinos ocorre principalmente por feridas superficiais, que podem ocorrer durante procedimentos comuns, como, castração, colocação de brincos, ou qualquer injúria generalizada no corpo do animal devido a outro evento traumático, como o tosqueamento no caso dos ovinos (DORELLA et al., 2006).

A patogenia exata da infecção é pouco compreendida. Sabe-se que a bactéria possui uma exotoxina, a fosfolipase D (COSTA, 2002), considerada um importante fator de virulência que desempenha papel na patogênese da linfadenite caseosa (JOHNSON et al., 1993), promovendo aumento da permeabilidade vascular e ruptura de pequenos vasos sanguíneos no local da lesão e conseqüente extravasamento de plasma, facilitando a difusão da bactéria aos linfonodos (JOHNSON et al., 1993; MCNAMARA et al., 1994; CHAPLIN et al., 1999). Nos estágios iniciais da infecção, essa enzima pode aumentar a sobrevivência e multiplicação da bactéria no hospedeiro (QUINN et al., 2005). No que diz respeito às propriedades biológicas da fosfolipase D, sabe-se que hidrolisa a lisofosfatidilcolina e esfingomiélin, fatores essenciais à formação de abscessos (DERCKSEN et al., 2000; COSTA, 2002).

Outro importante fator de virulência conhecido são os lipídeos de sua parede celular, que possuem semelhança ao ácido micólico do *Mycobacterium tuberculosis* (COSTA, 2002; QUINN et al., 2005); esses lipídeos dificultam a fagocitose da bactéria aumentando seu fator de virulência e promovendo toxicidade às células do hospedeiro (TASHJIAN; CAMPBELL, 1983; COSTA, 2002). Além disso, Mueller e Pieters (2006) relataram vários fatores de virulência e mecanismos de escape do sistema imune pelas micobactérias, as quais apresentavam várias similaridades com *C. pseudotuberculosis*. Congruente a isto, Tashjian e Campbell (1983) observaram que *C. pseudotuberculosis* é capaz de sobreviver no interior dos fagócitos podendo até ocasionar a morte dos mesmos, sendo resistente à morte e digestão pelos macrófagos.

Assim, essas mesmas bactérias evadem do sistema imune pela interrupção da maturação do fagossomo para fagolisossomo e ainda evitam o desenvolvimento de uma localizada resposta imune que pode ativar os macrófagos levando a destruição intracelular dos patógenos (MUELLER; PIETERS, 2006).

Salienta-se, ainda que a internalização deste grupo de bactérias nos macrófagos pode ser mediada por uma variedade de receptores que levam à sua entrada e liberação do microrganismo dentro do fagossomo da célula do hospedeiro (PIETERS, 2001; RUSSELL, 2001), uma vez dentro do fagossomo a micobactéria retém ou elimina uma série de moléculas do hospedeiro, prevenindo a maturação do fagossomo em fagolisossomo.

Acentuada queda de produção de leite, carne, e de lã, no caso dos ovinos, (ÇETINKAYA et al., 2002; DORELLA et al., 2006) associados com ineficiência reprodutiva e morte de alguns animais adultos (GATES et al., 1977), constituem aspectos importantes de prejuízos aos produtores. A condenação de carcaça em abatedouros e depreciação do valor do

couro (devido aos abscessos causados pelo agente) são importantes fatores econômicos (PATON et al., 1998; NOZAKI et al., 2000), principalmente para o comércio exterior (EGGLETON et al., 1991).

Infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* possuem alta prevalência na população de caprinos e ovinos em muitos países do mundo (ELLIS et al., 1991), onde existe grande criação de ovinos e caprinos como Austrália, Argentina, Nova Zelândia, África do Sul e em países da Comunidade Européia (MOURA COSTA, 2002). A linfadenite caseosa é uma das afecções que mais acomete o rebanho de ovelhas na Austrália. No noroeste Australiano a prevalência nos rebanhos é de 45%, os custos com a perda de produção é estimado em 10 a 15 milhões de dólares australianos e de 10 milhões de dólares australianos na indústria alimentícia (HOGDSON et al., 1994). Já Çetinkaya et al. (2002) relata que esta afecção apresenta uma grande importância econômica nos rebanhos de caprinos e ovinos nos Estados Unidos, Canadá e Austrália, sendo reportada uma perda de 17 milhões de dólares na produção australiana por ano. Canadá e relatam que 21% dos animais são portadores de linfadenite caseosa.

Em 2003, Carminatti et al. relataram que a linfadenite caseosa possui uma alta prevalência nos rebanhos de caprinos da região Nordeste do Brasil, sendo também relatada em diversos estados brasileiros.

A disseminação da infecção ocorre por meio do pus proveniente da ruptura de abscessos e descargas oro-nasais entre animais com infecção pulmonar (CHAPLIN et al., 1999; RIBEIRO et al., 2001; QUINN et al., 2005). A transmissão entre os pequenos ruminantes ocorre principalmente por contato direto da pele ou membranas mucosas lesadas – geralmente através de procedimentos como a tosquia, castração, colocação de brincos – ou através de danos gerados ao corpo do animal por eventos traumáticos (RIBEIRO et al., 2001; DORELLA et al., 2006). A transmissão pela forma indireta também é citada na literatura como forma de contágio importante e se dá através da contaminação do ambiente, água e alimentos com o material purulento dos linfonodos, podendo gerar a formação de aerossóis (CHAPLIN et al., 1999; RIBEIRO et al., 2001), uma vez que o agente pode sobreviver no meio ambiente por vários meses (QUINN et al., 2005). Todavia, Ribeiro et al. (2001) em um estudo onde, entre outros objetivos, tentaram isolar a bactéria de fezes e ambiente (canzil, bebedouro, ração e instalações), de animais acometidos, demonstraram a dificuldade do isolamento, corroborando com Radostittis et al. (1994), que referem tal dificuldade.

As manifestações clínicas da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes são caracterizadas, principalmente, por necrose caseosa nos linfonodos superficiais e tecidos

subcutâneos; podendo desenvolver-se, em casos mais severos, em órgãos internos como pulmões, fígado, baço e rins – caracterizando a forma visceral da doença. Os abscessos são encapsulados com material purulento, denso e caseoso (CHIRINO-ZÁRRAGA et al., 2006, DORELLA et al., 2006; FONTAINE et al., 2006). Os animais acometidos perdem peso progressivamente devido à anorexia, podendo vir a óbito posteriormente por causa da toxemia (CHIRINO-ZÁRRAGA et al., 2006). A doença em humanos é semelhante à dos caprinos (COSTA, 2002; QUINN et al., 2005).

O diagnóstico é baseado, principalmente, sintomas (ÇETINKAYA et al., 2002) e no isolamento e identificação do agente, proveniente de material dos abscessos (QUINN et al., 2005). Testes sorológicos têm sido utilizados (ÇETINKAYA et al., 2002) e os testes mais comumente empregados são o ELISA, teste de fixação de complemento, teste de imunodifusão em gel de ágar e teste de inibição da hemólise (DERCKSEN et al., 2000; RIBEIRO et al., 2001; PRESCOTT et al., 2002). O PCR se mostrou um teste bastante específico no que diz respeito às infecções inaparentes (ÇETINKAYA et al., 2002).

O tratamento da linfadenite caseosa é controverso, alguns autores como Ribeiro et al. (2001) e Senturk e Temizel (2006) defendem a associação de antimicrobianos, outros autores como Johnson et al. (1993), acreditam que o tratamento não deva ser feito, uma vez que, não demonstra eficácia, isto porquê os antimicrobianos não chegam ao foco da lesão em concentrações adequadas, sendo o controle dos animais do rebanho a melhor forma de prevenção.

A erradicação da doença é difícil, devido à rápida disseminação quando introduzida no rebanho (ÇETINKAYA et al., 2002). O controle da enfermidade tem sido feito através de diagnóstico e descarte dos animais positivos, sendo o teste ELISA indireto amplamente utilizado, facilitando a triagem dos animais (DERCKSEN et al., 2000; CARMINATI et al., 2003; PAULE et al., 2003). A utilização de vacinas para controle da linfadenite caseosa dos caprinos não apresenta resultados consistentes, uma vez que não oferece adequada imunoproteção à espécie (RIBEIRO et al., 1991; FONTAINE et al., 2006).

Pelo fato de ser um patógeno intracelular facultativo, a imunidade contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* é complexa e envolve resposta imune celular e humoral (ELLIS et al., 1990; PRESCOTT et al., 2002), no entanto, muitos estudos apontam para uma maior resposta celular, principalmente do tipo Th1, a uma resposta humoral (PEPIN et al., 1997; LAN et al., 1998; SIMMONS et al., 1998). Pepin et al. (1991) observaram a relação entre citocinas produzidas por células T CD4+ com o desenvolvimento de piogranulomas e a persistência da bactéria no hospedeiro e descreveram uma alta produção de IFN- γ e baixa

produção de IL-4. Contrariamente, Paule et al. (2003) num estudo sobre a cinética da produção de IgG e IFN- γ , não demonstraram correlação entre a severidade da infecção e a resposta de IFN- γ . De qualquer forma, a modulação da resposta imune pelo controle da expressão de moléculas de MHC classe I e II por alguns tipos celulares, a ativação e regulação da diferenciação de fagócitos e a habilidade para regular a ativação e a diferenciação de células T CD4+, estabelecem IFN- γ como uma chave na determinação do componente e tipo de função que será desenvolvido durante o curso da resposta imune; assim o papel desta citocina é fundamental na defesa do hospedeiro contra infecção por agentes intracelulares (MEYER et al., 2005).

Pancholi et al. (1993) relataram que monócitos humanos *in vitro*, cronicamente infectados com *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette – Guérin (BCG), apresentavam menor habilidade de apresentar antígenos de micobactérias. Outros grupos demonstraram também uma menor capacidade de processamento e apresentação de antígenos como resultado da infecção intracelular que pode ser explicada em partes por uma das razões a seguir:

1. Diminuição da viabilidade dos macrófagos como resultado da infecção.
2. Alteração da habilidade dos macrófagos em funcionar adequadamente, por exemplo, devido à internalização do antígeno,
3. Mudança na expressão de moléculas de superfície como a MHC II ou outras moléculas acessórias importantes na estimulação de células T (VANHEYNINGEN et al., 1997).

No que diz respeito à produção de imunoglobulinas, Desiderio et al. (1979) mostraram que cabras com infecção crônica apresentavam baixos níveis de α_2 e β -globulinas em comparação a animais saudáveis e, estes mesmos animais infectados apresentavam altos valores para γ - globulina, corroborando com Paule et al. (2003) que também observaram altos níveis de IgG. Segundo Ellis (1988), anticorpos anti-exotoxina de *C. pseudotuberculosis* podem proteger os tecidos contra danos mediados pela exotoxina e a disseminação do microrganismo e anticorpos opsonizantes podem aumentar a fagocitose de neutrófilos e macrófagos, dessa forma a resposta mediada por células pode ser essencial para a eliminação do microrganismo.

2.3 IMUNIDADE INATA

A resposta imune do hospedeiro frente a alguns microrganismos invasores pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A resposta imune adaptativa compreende imunidade humoral mediada por anticorpos e imunidade mediada por células T e, geralmente, leva horas ou dias para se iniciar. Diferente desta, a imunidade inata desencadeia uma resposta rápida frente à patógenos invasores, sendo considerada a primeira linha de defesa contra microrganismos (PLÜDDEMANN et al., 2006).

Todos os indivíduos saudáveis são protegidos pela imunidade inata, cujas características são uma limitada capacidade para distinguir um agente do outro, e sua natureza estereotípica, segundo o qual ela funciona quase do mesmo modo contra a maioria dos agentes infecciosos. Dentre os componentes desta imunidade, pode-se citar células fagocíticas, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos “natural killers”. Destas células, merecem especial atenção os macrófagos por serem alvos de diversos agentes de espécies diferentes, como os vírus e algumas bactérias (ABBAS et al., 2000; PENG et al., 2007).

Macrófagos são células derivadas dos monócitos sangüíneos, que por sua vez são derivados de células do sistema hematopoiético da medula óssea (FELDMAN et al., 2000) e assim como os macrófagos, são células do sistema reticuloendotelial por apresentarem características fagocíticas (TIZARD, 1998; FELDMAN et al., 2000; KERR, 2003). Na medula óssea, por influência de proteínas chamadas de fatores estimuladores de colônias, os monoblastos, que são as células precursoras dos monócitos, após uma mitose, dão origem aos promonócitos (FELDMAN et al., 2000; KERR, 2003). Após duas sucessivas mitoses são lançados na circulação sanguínea onde são chamados de monócitos e quando deixam a circulação sanguínea e migram para outros tecidos e recebem o nome de acordo com o tecido migrado (TIZARD, 1998; FELDMAN et al., 2000). Todas estas células pertencem ao sistema mononuclear fagocítico. Esta classificação envolve características morfológicas e funcionais, apesar de toda diversidade em diferentes estágios de maturação (FELDMAN et al., 2000), dessa forma nos sinusóides vasculares do fígado recebem o nome de células de Küpffer, no sistema nervoso central recebem o nome de células microgliais, nos ossos recebem o nome de osteoclastos, nos tecidos de histiócitos e nos pulmões são classificados como macrófagos alveolares (TIZARD, 1998; ABBAS et al., 2000; FELDMAN et al., 2000; KERR, 2003; PLÜDDEMANN et al., 2006; GORDON, 2007).

Os monócitos são as maiores células dentre os leucócitos circulantes (KERR, 2003; GORDON, 2007). São caracterizados por apresentarem núcleo alongado e com contornos irregulares (TIZARD, 1998; KERR, 2003; FELDMAN et al., 2000). A cromatina nuclear pode apresentar algumas áreas de condensação. O citoplasma é constituído de complexo de Golgi bem desenvolvido, alguns polirribossomos, alguns grânulos que variam em tamanho e formato, algumas vesículas e pouca cisterna de retículo endoplasmático rugoso, desta forma, podem ser confundidos com neutrófilos imaturos (KERR, 2003; FELDMAN et al., 2000).

As características morfológicas, citoquímicas e metabólicas são dependentes da maturidade dos monócitos, locais de origem, condições ambientais e grau de estimulação. Porém, os macrófagos geralmente são ovais, possuem núcleos alongados ou arredondados e nucléolo proeminente (TIZARD, 1998). O citoplasma é abundante com grânulos azurofílicos e vacúolos de tamanhos variados, mitocôndria, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos (TIZARD, 1998; FELDMAN et al., 2000).

A diferenciação dos monócitos em macrófagos *in vitro* é acompanhada pelo aumento do tamanho celular, utilização de glicose, produção de lactato, atividades fagocíticas, síntese enzimática e atividade das enzimas hidrolíticas, porém uma redução na capacidade de produzir água oxigenada e radicais superóxidos são observados (FELDMAN et al., 2000).

Os monócitos e os macrófagos apresentam receptores de superfície para a porção Fc de imunoglobulinas, bem como receptores para os componentes do complemento C3b e C3d. Estas células também apresentam receptores para glicocorticóides e hormônios como a insulina, glucagon e tiotropin. Estes receptores podem ser alterados por procedimentos *in vitro*, por uma doença ou por terapia (FELDMAN et al., 2000; GORDON, 2007).

Componentes do complemento como o C3a e o C5a são quimiotáticos para os monócitos. Uma particularidade dos monócitos é que eles são altamente quimiotáticos para os lipídios ou para materiais ricos em lipídios, como o lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas e o leite (FELDMAN et al., 2000).

Os monócitos exercem sua função após a sua transformação em macrófagos. A capacidade de fagocitose das células aumenta conforme a evolução da maturação das células de pró-monócitos para macrófagos. Os monócitos possuem a característica de fagocitar e remover os microrganismos, porém em menor grau do que os neutrófilos (TIZARD, 1998; FELDMAN et al., 2000; PENG et al., 2007). São os responsáveis pela eliminação de microrganismos intracelulares (KERR, 2003; FELDMAN et al., 2000), frente à doenças causadas por vírus, levam à produção de interferon pelas células do sistema mononuclear

fagocítico e são também responsáveis pela degradação dos complexos antígenos-anticorpo (FELDMAN et al., 2000; PENG et al., 2007).

Alguns estudos na literatura indicam que os receptores C3 presente nos monócitos, são responsáveis pelo aumento da aderência destas células com os antígenos, mas não a fagocitose e metabolismo oxidativo, fato que acontece com os receptores Fc que induzem a aderência e a fagocitose. Porém quando os dois receptores estão juntos, apresentam uma ação sinérgica (FELDMAN et al., 2000). Após a fagocitose ocorre uma interação do microrganismo com o fagossomo e os macrófagos sintetizam substâncias que propiciam a eliminação do microrganismo. Estas células desempenham funções bactericidas, fungicidas e citotóxicas através do metabolismo oxidativo. Os produtos deste metabolismo produzidos pelas células do sistema mononuclear fagocítico são menores do que os produzidos pelos neutrófilos, mas suficiente para a eliminação do microrganismo (FELDMAN et al., 2000).

Além da função de fagocitose de microrganismos invasores, os monócitos e os macrófagos são responsáveis pela remoção de células mortas ou em processo de morte (TIZARD, 1998; FELDMAN et al., 2000). Portanto, os macrófagos reconhecem as modificações da membrana de hemáceas e leucócitos causadas por lesões químicas e por doenças através da opsonização por anticorpos ou complemento. Após a fagocitose, a membrana dos eritrócitos é digerida por enzimas presentes nos vacúolos das células e as moléculas de hemoglobina são degradadas (FELDMAN et al., 2000).

A interação dos macrófagos com os antígenos se dá através dos receptores de membrana. Dessa forma o antígeno depois de ligado aos macrófagos são processados e apresentados aos linfócitos T e B, ocorrendo em seguida o desencadeamento da resposta imune e a partir dessa apresentação, os linfócitos produzem anticorpos específicos para os antígenos apresentados pelos macrófagos (FELDMAN et al., 2000; GORDON, 2007).

Quando os monócitos e os macrófagos estão em repouso e recebem estímulos inflamatórios, tornam-se macrófagos inflamatórios (TIZARD, 1998). Pela ação de substâncias como interferons, complemento e produtos bacterianos, os macrófagos tornam-se ativados (TIZARD, 1998; FELDMAN et al., 2000; PENG et al., 2007) e apresentam muitas mudanças morfológicas, metabólicas e funcionais. Tornam-se maiores, ricos em organelas intracelulares tal como os lisossomos e as mitocôndrias e apresentam um complexo de Golgi maior. Desta forma, as atividades metabólicas tal como a síntese de proteínas, a secreção e a síntese de enzimas lisossomais estão aumentadas. Além disso, os macrófagos ativados apresentam maior expressão de receptores de superfície e exibem aumento da fagocitose, quimiotaxia, atividade digestiva, microbicida e citotóxica (TIZARD, 1998; FELDMAN et al., 2000).

Os macrófagos são responsáveis pela liberação de substâncias como lisozima, componentes do complemento, entre outros. Quando ativados secretam proteases lisossomais, collagenases, elastases, ativadores de plasminogênio e proteínas que são essenciais na regulação da imunidade que são as IL-1, IL-2, IL-12 e o TNF- α , as quais são classificadas como citocinas (TIZARD, 1998; FELDMAN et al., 2000).

A fagocitose e a destruição intracelular de patógenos pelos macrófagos são importantes ferramentas do sistema imune inato durante a infecção (GORDON, 2007; FRANKENBERG et al., 2008). Neste processo os patógenos são capturados através de extensão da membrana citoplasmática (pseudópodos) que se estende ao redor da partícula ingerida formando a membrana fagossomal (GORDON, 2007). O conteúdo fagossomal se assemelha ao meio extracelular o qual não tem competência para destruir e eliminar o microrganismo ingerido. Contudo, rapidamente após o fechamento da membrana plasmática o fagossomo sofre uma série de modificações rápidas e extensivas em sua composição que é sucedido por várias fusões e fissões da membrana e posteriormente se liga ao lisossomo, tornando-se o fagolisossomo (MUELLER; PIETERS, 2006; FRANKENBERG et al., 2008). A fagocitose é mediada simultaneamente e cooperativamente por muitos receptores que se encontram na superfície da membrana dos macrófagos e em compartimentos intracelulares.

Um importante receptor é o receptor de reconhecimento padrão (RRP) que possui diversas funções as quais incluem opsonização, ativação de complemento e da cascata de coagulação, fagocitose, ativação de sinalizadores pró-inflamatórios e indução da apoptose. Outro importante componente presente nos macrófagos são os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), cuja habilidade é de reconhecer e responder a um vasto número de microrganismos. Os PAMPs atuam juntamente com os “Toll-like receptor” (TLR), que têm a habilidade de reconhecer PAMPs distintos. Os TLR compreendem uma família de RRP que são capazes de reconhecer distintos PAMPs. Cerca de 12 famílias de TLR têm sido identificadas nos mamíferos, e cada membro é capaz de reconhecer um distinto PAMP (BANNERMAN et al., 2004).

A fagocitose de células da linhagem monócito-macrófagos é dependente não só de estruturas de defesa dessas células, mas também de diversas ferramentas constituintes na estrutura dos microrganismos, as quais desencadeiam sinalização de diferentes receptores que irão modular diferentes respostas, muitas vezes saindo da resposta inata e partindo-se para a resposta adaptativa, conferindo-se, portanto, a imunidade do hospedeiro (UNDERHILL; OZINSKY, 2002). Todavia, alguns microrganismos intracelulares podem alterar esta resposta, interferindo diretamente no genoma celular, como é o caso de alguns vírus que têm as células

da linhagem monócito-macrófago como alvo para sua replicação. Nesse caso, após serem fagocitados, liberam seu ácido nucléico no citoplasma celular para que as sínteses de DNA, RNA e de proteínas da célula do hospedeiro sejam inibidas de forma que somente a informação genética viral seja processada, alterando-se, portanto, a função celular e privilegiando a replicação viral (TIZARD, 1998).

Bactérias intracelulares se aproveitam do mecanismo da fagocitose para adentrar nas células alvo e desta maneira se multiplicar; esses microrganismos possuem algumas ferramentas para deflagrar a resposta celular obtendo êxito na colonização celular, como é o caso da linfadenite caseosa, cujos fatores de virulência da bactéria são capazes de causar dano aos macrófagos do hospedeiro, como vesiculação do citoplasma, danos mitocondriais e dilatação do retículo endoplasmático (TASHJIAN et al., 1983). Desta forma, a imunidade inata isoladamente é eficaz contra muitos microrganismos, todavia, pode ser ineficiente ao se tratar de patógenos intracelulares, como o caso dos vírus e algumas bactérias, onde as células desse sistema numa tentativa de proteger o organismo acabam servindo de ferramenta para que a infecção se alastre.

3 OBJETIVO

Avaliar o efeito da infecção pelo VAEC sobre a capacidade fagocitária de mononucleares para *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse capítulo serão descritos a seleção dos animais, os critérios de inclusão amostral das coletas, as análises, as quais as amostras foram submetidas, e a avaliação estatística.

4.1 ANIMAIS EMPREGADOS

Foram empregadas 30 cabras da raça Saanen, provenientes do rebanho experimental do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP) e de dois capris localizados no município de Ibiúna, Estado de São Paulo.

Todos os animais apresentavam bom estado nutricional com escore corporal entre 3 e 3,5, não se encontravam em fase puerperal e não foram submetidos a tratamento com glicocorticóides nos 30 dias que antecederam o experimento.

Os animais foram distribuídos por dois grupos experimentais conforme o resultado da prova de imunodifusão para pesquisa de anticorpos anti VAEC, sendo o Grupo 1 constituído por animais sorologicamente negativos para CAE e o Grupo 2 por animais com sorodiagnóstico positivo para CAE.

4.2 COLETA DE SANGUE

Foram coletadas de cada animal, por venopunção jugular externa, utilizando-se sistema à vácuo e agulhas para múltiplas coletas (25 mm X 8 mm), Vacutainer^{®1}, uma amostra de sangue em tubo siliconizado sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL, três amostras de sangue em tubo siliconizado contendo heparina sódica, com capacidade de 10

¹Becton Dickinson, referência 360212, Plymouth, UK

mL, e uma amostra de sangue em tubo siliconizado com EDTA tripotássico na proporção de 1,5 mg/mL de sangue (capacidade para 5 mL).

Todas as amostras foram identificadas e seguiram imediatamente, após a coleta, para o laboratório de Imunodiagnóstico da FMVZ – USP, sob condições de refrigeração.

As amostras de sangue dos tubos sem anticoagulante foram centrifugadas por 10 minutos a 1877 x g para obtenção de soro, a partir do qual foi realizado o sorodiagnóstico para AEC.

As amostras de sangue dos tubos com EDTA foram utilizadas para realização do hemograma completo e as amostras de sangue dos tubos com heparina destinaram-se a recuperação de células para a realização das provas de fagocitose.

4.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

O hematócrito e o número total de eritrócitos e leucócitos foram mensurados como descrito por Feldman et al. (2000). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de esfregaços sangüíneos corados pelo corante de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) e a diferenciação do padrão leucocitário por microscopia óptica com aumento de 1000 X.

Quadro 1 – Valores de referência do contagem eritrocitária e do volume globular médio e do leucograma¹ de caprinos sadios – São Paulo, 2008

Eritrócitos (x10 ⁶ /ml)	8,0 – 18,0 (13,0)
Volume Globular (%)	22,0 – 38,0 (28,0)
Leucócitos (x 10 ³ /ml)	4.000 – 13.000 (9.000)
Linfócitos (µl)	2.000 – 9.000 (5.000)
Neutrófilos (µl)	1.200 – 7.200 (3.250)
Eosinófilos (µl)	50 – 650 (450)
Monócitos (µl)	0 – 550 (250)
Basófilos (µl)	0 – 120 (50)

¹Valores expressos em número absoluto (Média).
Fonte: Feldman et al., 2000

4.4 SORODIAGNÓSTICO

Para a detecção de anticorpos séricos antivírus da AEC foi empregada a técnica de imunodifusão radial dupla em gel de ágar de Ouchterlony realizada segundo técnica preconizada por Cutlip et al. (1977) e recomendada pelo Escritório Internacional de Epizootias para triagem e trânsito internacional de animais (OIE, 2007); utilizando-se o antígeno e protéico (p28) extraído do capsídeo do vírus da AEC.

O gel para realização da prova de IDGA foi preparado, seguindo as normas do fabricante² para detecção de anticorpos anti-vírus da artrite-encefalite dos caprinos. Inicialmente, aqueceu-se o frasco da agarose fornecida no kit até a plena dissolução do ágar e posteriormente distribuiu-se 14 ml dessa solução em placas de Petri de plástico com 90 mm de diâmetro. Esperou-se a solidificação do gel e as placas foram colocadas sob refrigeração para atingir consistência firme de maneira que pudessem ser perfuradas com molde metálico, em formato de roseta, contendo seis poços externos e um central, todos com diâmetro de 4 mm e equidistantes da perfuração central.

A leitura das provas se deu em dois momentos, sendo o primeiro após 48 horas de incubação e a segunda após 72 horas de incubação. Ambas foram realizadas em local escuro com auxílio de incidência luminosa (lanterna), aplicada na parte debaixo da placa para observação das reações.

4.5 PREPARO DE BACTÉRIA PARA ENSAIO *IN VITRO*

Corynebacterium pseudotuberculosis foi isolada de cabra com linfonodos aumentados de volume por punção aspirativa e posteriormente semeadas em placas de ágar-sangue contendo 5 % de sangue de carneiro desfibrinado, e incubadas a 37° C por 72 horas (ÇETINKAYA et al., 2002). A identificação do agente foi feita por coloração de Gram e

² Kit para Diagnóstico da CAE (IDGA), Biovetech, Recife – PE.

testes bioquímicos foram realizados para confirmação do agente, através de kit comercial³, seguindo-se recomendação do fabricante.

A quantidade de *C. pseudotuberculosis* utilizada para os testes de fagocitose foi de 6 bactérias para cada célula (6:1) (RAJAVELU; DAS, 2007; KAPETANOVIC et al., 2007) e foi mensurada através da Escala 10 de Mac Farland (tubo 10), correspondente a 30×10^8 de microrganismo/ ml (BIER, 1984).

Para isto, utilizou solução fisiológica 0,9% onde diluiu-se a bactéria e a concentração foi ajustada por espectrofotômetro com comprimento de onda de 580 nm e transmitância 4.

4.6 ISOLAMENTO DE MONÓCITOS

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram isoladas por gradiente de concentração em Ficoll – Plaque Plus^{®4} ($d = 1,077$).

Para definir se a amostra possuía células suficientes para a realização das provas propostas e se estas células possuíam vitalidade conveniente (se estavam vivas ou viáveis), uma alíquota de 10 μ L da suspensão de celular (células ressuspendidas em 1mL de RPMI 1640) foi adicionada a 90 μ L de solução de azul de Trypan a 0,1 % (MERCK[®]) e realizada a contagem de leucócitos do sangue em câmara de Neubauer, no quadrante dos leucócitos, em microscopia óptica (microscópio OLYMPUS[®]) com aumento de 400 $\times$.

Após teste de viabilidade por exclusão do azul de Trypan, as células foram ressuspendidas em RPMI-1640⁵ para atingirem uma concentração final de 1×10^7 células/ml.

Dentro dos poços de placas de poliestireno, com 24 poços de 16 mm de diâmetro (COSTAR^{®6}), colocou-se lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro e, sobre estas, 1 ml da suspensão celular. A placa foi, então, colocada em estufa em 5% de CO₂ a 37°C por 1 hora

³ Kit Api Coryne[®] para Diagnóstico Microbiológico de *Corynebacterium psudotuberculosis*, referência 20900, Biomérieux, França.

⁴ Ficoll – Plaque Plus GE Healthcare, referência 17-1440-03, $d = 1.077$, Uppsala, Suécia.

⁵ RPMI 1640 Sigma Aldrich, referência R7638, Saint Louis, USA

⁶ Corning Incorporated COSTAR, referência 3524, Corning, USA

para isolamento e adesão dos monócitos nas lamínulas, segundo técnica empregada por Stabel et al. (1997).

4.7 TESTE DE FAGOCITOSE

Após o período de incubação dos monócitos, adicionou-se à placa alíquotas de 20 µl da suspensão celular, correspondente a 6×10^7 de bactérias, em cada poço.

As placas foram incubadas a 37°C durante 2 horas em 5% de CO₂, e fixadas com glutaraldeído a 0,5% por 10 minutos.

Inicialmente, a leitura das lamínulas foi realizada por microscopia óptica em aumento de 1000 X, após coloração com o corante de Rosenfeld na diluição 1:2, ou seja 1 mL de corante e 2 mL de água destilada por 4 minutos, onde se contou 400 células. Para a qualificação e quantificação da série monócito-macrófago, as células foram classificadas em seis grupos, a saber:

1. Monócitos aderidos
2. Monócitos fagocitando *Corynebacterium pseudotuberculosis*
3. Macrófagos aderidos
4. Macrófagos espalhados
5. Macrófagos que fagocitaram até 12 *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Fagocitose +).
6. Macrófagos que fagocitaram mais de 12 *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Fagocitose ++)

4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS CELULARES

Para o desenvolvimento do presente estudo foi imprescindível a diferenciação e discriminação dos diferentes grupos celulares de acordo com suas características morfofuncionais como descrita abaixo:

4.8.1 Monócitos Aderidos

Foram caracterizadas como monócitos as células que apresentavam citoplasma escasso, apesar do núcleo ser considerado pleomórfico, predominou-se as formas reniforme e oval (Figura 7).

4.8.2 Monócitos Fagocitando *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Monócitos que apresentavam presença de partículas bacterianas no interior de vacúolos citoplasmáticos pequenos indicando fagocitose (Figura 10).

4.8.3 Macrófagos Aderidos

Macrófagos que tinham em comum um citoplasma abundante, com presença de pequenos vacúolos, sendo encontrado com frequência variações no tamanho. O núcleo geralmente apresentava formato reniforme ou arredondado de localização periférica ou central (Figura 8).

4.8.4 Macrófagos Espreados

Características similares ao anterior, no entanto observou-se a presença de projeções e vacúolos citoplasmáticos (Figura 9).

4.8.5 Fagocitose +

Macrófagos que apresentavam presença de partículas (até doze bactérias) no interior de vacúolos citoplasmáticos indicando fagocitose (Figura 11).

4.8.6 Fagocitose ++

Macrófagos que apresentavam presença de partículas (mais de doze bactérias) no interior de vacúolos citoplasmáticos indicando fagocitose (Figura 12).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados observados, utilizando-se do teste de Anderson-Darling e sua homoscedasticidade utilizando-se do teste F. Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados, foi feito o teste de análise variância (One-way ANOVA).

Para a avaliação das correlações entre os dados observados, foi realizada a análise do coeficiente de correlação de Pearson, utilizando-se do critério de classificação indicado por Callegari-Jacques (2003).

Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $p \leq 0,05$. Os dados estão expressos como média ($\pm$ desvio padrão).

Nas avaliações estatísticas, foi utilizado o software estatístico MINITAB®, versão 15 (Global Tech InformáticaTM, Belo Horizonte, MG).

5 RESULTADOS

Foi verificada nas populações estudadas, a presença de animais soropositivos para o VAEC. Tais resultados permitiram, por conseguinte, a seleção aleatória de cabras para composição dos grupos experimentais, das quais as amostras sanguíneas foram obtidas e submetidas à avaliação do espreiamento e da capacidade fagocítica das células da série monócito-macrófago *in vitro* frente à bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

5.1 TRIAGEM E FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram triados 80 animais adultos provenientes do rebanho experimental do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP) e de dois capris localizados no município de Ibiúna (São Paulo).

De acordo com o resultado obtido através da técnica de IDAG, para verificação de anticorpos séricos antivírus da AEC, obteve-se 48,75% dos animais soropositivos e 51,25% dos animais soronegativos (Figura 1), correspondente a 39 e 41 animais, respectivamente.

Figura 1- Distribuição dos resultados da imunodifusão em gel de ágar (IDAG) para o diagnóstico da artrite encefalite caprina de 80 caprinos da raça Saanen – São Paulo – 2008

Para composição do grupo experimental 30 animais foram selecionados e alocados em dois distintos grupos, sendo um grupo formado por 15 animais negativos ao teste sorológico para detecção de anticorpos séricos antivírus da AEC e o outro grupo formado por 15 animais reagentes ao teste, sendo, portanto denominado grupo positivo .

5.2 AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA DOS ANIMAIS SELECIONADOS

Os resultados do hematócrito, da contagem total de eritrócitos e de leucócitos, assim como da contagem diferencial absoluta de leucócitos dos animais selecionados estão discriminados, conforme o sorodiagnóstico, apresentados na tabela 1 e figuras 2, 3, 4 e 5.

Tabela 1- Resultados médios da contagem de eritrócitos e leucócitos e percentual de volume globular médio, em números absolutos (média $\pm$ desvio padrão) e %, respectivamente, dos 30 animais da raça Saanen, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2008

Parâmetros	Grupo Negativo (n = 15)	Grupo Positivo (n = 18)	p
	Média ($\pm$ DP)	Média ($\pm$ DP)	
Eritrócitos (x 10 ⁶ /ml)	13,89 ($\pm$ 3,36)	13,92 ($\pm$ 2,44)	0,97
Hematócrito (%)	28,53 ($\pm$ 6,09)	26,40 ($\pm$ 5,22)	0,31
Leucócitos (x 10 ³ /ml)	15,05 ($\pm$ 4,26)	13,78 ($\pm$ 2,05)	0,30
Linfócitos (μ l)	8,17 ($\pm$ 3,98)	6,59 ($\pm$ 2,63)	0,21
Neutrófilos (μ l)	6,43 ($\pm$ 2,12)	6,72 ($\pm$ 1,96)	0,70
Eosinófilos (μ l)	0,20 ($\pm$ 0,18)	0,32($\pm$ 0,33)	0,24
Monócitos (μ l)	0,25 ($\pm$ 0,23)	0,15 ($\pm$ 0,07)	0,11
Basófilos (μ l)	0,00	0,00	

DP = Desvio Padrão

Figura 2 - Distribuição dos dados do volume globular (%) dos 30 caprinos da raça Saanen nos distintos grupos experimentais - São Paulo - 2008

A avaliação do volume globular médio dos animais dos grupos experimentais não mostrou diferença estatística (Tabela 1 e Figura 2) e possibilitou descartar quadros de desidratação e anemia.

Figura 3 - Distribuição dos dados da contagem de eritrócitos ($10^6/\text{ml}$) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

A contagem eritrocitária não apresentou diferença entre os animais dos grupos experimentais (Tabela 1 e Figura 3) e possibilitou descartar quadros de anemias.

Figura 4 - Distribuição dos dados de Leucócitos ($10^3/\text{ml}$) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

Conforme demonstrado na tabela 1 e figura 4, os valores leucocitários não divergiram entre os grupos confirmando a homogeneidade na formação dos grupos experimentais. O mesmo se deu nas contagens absoluta e relativa de cada população de leucócitos (Tabela 2 e Figuras 5 e 6), onde os animais dos diferentes grupos analisados demonstraram uniformidade.

Figura 5 - Distribuição dos dados da contagem absoluta das diferentes populações de leucócitos ($10^3/\text{ml}$) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

Tabela 2 - Resultados médios e desvios padrão da contagem diferencial relativa de leucócitos sanguíneos (%) (média $\pm$ desvio padrão), de caprinos distribuídos em função do grupo experimental – São Paulo – 2008

Parâmetros (%)	Grupo Negativo (n = 15)	Grupo Positivo (n = 18)	p
	Média ($\pm$ DP)	Média ($\pm$ DP)	
Linfócitos	52,47 ($\pm$ 15,21)	47,00 ($\pm$ 15,29)	0,33
Neutrófilos	44,33 ($\pm$ 15,27)	49,53 ($\pm$ 14,96)	0,35
Eosinófilos	1,53 ($\pm$ 1,40)	2,40 ($\pm$ 2,35)	0,23
Monócitos	1,66 ($\pm$ 1,67)	1,07 ($\pm$ 0,46)	0,19
Basófilos	0,00	0,00	

DP = Desvio Padrão

Figura 6 - Distribuição dos resultados da contagem relativa das diferentes populações de leucócitos ($10^3/\text{ml}$) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

5.3 ENSAIO DE ESPRAIAMENTO E FAGOCITOSE

A avaliação do espraio e da capacidade fagocítica das células da série monócito-macrófago dos animais dos grupos experimentais frente à bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* não apresentou diferença significativa (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação da fagocitose (%) *in vitro* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, por células da série monócito-macrófago obtidas de amostras sangüíneas (média $\pm$ desvio padrão) de caprinos negativos ao sorodiagnóstico para o VAEC– São Paulo – 2008

	Negativo (n= 15)	Positivo (n= 18)	p
Monócito	9,03 (3,67)	11,51 (4,14)	0,09
Macrófago	28,49 (8,83)	23,49 (9,93)	0,18
Macrófago Espreado	10,03 (3,63)	9,21 (3,76)	0,55
Fagocitose Total	52,39 (8,93)	55,45 (11,12)	0,41

Figura 07 - Foto micrografia de monócito de caprino aderido com citoplasma escasso e núcleo abundante

Figura 8 - Foto micrografia de macrófago de caprino aderido com citoplasma abundante e presença de vacúolos citoplasmáticos e núcleo com cromatina frouxa

Figura 9 - Foto micrografia de macrófago espraído de caprino com formação de pseudópodos.

No entanto, ao discriminar a fagocitose dos macrófagos conforme a quantificação do número de partículas fagocitadas (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), observou-se uma diferença significativa entre os grupos formados conforme o resultado do sorodiagnóstico da AEC, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação dos índices de fagocitose (%) *in vitro* discriminada em dois diferentes grupos conforme o número de partículas fagocitadas (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) por células da série monócito-macrófago (média $\pm$ desvio padrão) de caprinos da raça Saanen, separados em função do sorodiagnóstico para a AEC– São Paulo – 2008

	Negativo (n= 15)	Positivo (n= 15)	p
Monócito Fagocitando	2,081 (1,55)	2,89 (2,19)	0,250
Fagocitose +	34,87 (5,91)	27,67 (4,83)	0,012
Fagocitose ++	15,45 (8,62)	24,88 (10,44)	0,001

Figura 10 - Foto micrografia de monócito de caprino fagocitando a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Figura 11 - Foto micrografia macrófago caprino fagocitando (+) a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Figura 12 - Foto micrografia de macrófago caprino fagocitando (++), apresentando citoplasma abundante e vacuolizado contendo em alguns destes a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Figura 13 - Distribuição dos dados das diferentes porcentagens de macrófagos, macrófagos que espalharam e macrófagos que fagocitaram *Corynebacterium pseudotuberculosis* dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

Figura 14 - Distribuição dos dados das diferentes porcentagens de monócitos e monócitos que fagocitaram *Corynebacterium pseudotuberculosis* dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

Conforme ilustrado na figura 15 e na tabela 4, não foi observada uma diferença significativa na capacidade fagocítica de monócitos entre os grupos. Todavia, observou-se uma diferença quantitativa da fagocitose entre os macrófagos, isto é, os macrófagos do grupo positivo tiveram maior porcentagem de células fagocitando mais partículas (acima de 12 bactérias) ($p<0,001$), conforme ilustrado nas figuras 12 e 15. Ao comparar-se com o grupo de animais negativos que apresentaram macrófagos fagocitando até 12 bactérias ($p<0,012$) (Figura 11).

Figura 15 - Distribuição dos dados das diferentes porcentagens de macrófagos que fagocitaram até 12 *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Fagocitose +) e macrófagos que fagocitaram mais de 12 *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Fagocitose ++) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

Figura 16 - Correlação entre a porcentagem de monócitos que fagocitaram até 12 partículas (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) (Fagocitose +) e macrófagos que fagocitaram mais de 12 bactérias (Fagocitose ++) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

Verificou-se correlação positiva entre a porcentagem de macrófagos com fagocitose ++ e a porcentagem de monócitos fagocitando ($r = 0,488$; $p = 0,006$) nos distintos grupos (Figuras 10 e 16).

Figura 17 - Correlação entre a porcentagem de monócitos que fagocitaram até 12 partículas (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) (Fagocitose +) e macrófagos que fagocitaram mais de 12 bactérias (Fagocitose ++) dos 30 caprinos da raça Saanen, nos distintos grupos experimentais – São Paulo – 2008

Ademais, foi verificado uma correlação significativa ($r = 0,748$, $p < 0,001$) entre a porcentagem de macrófagos com fagocitose ++ e a porcentagem de monócitos fagocitando (Figura 17) nos animais soropositivos, sendo o mesmo não encontrado no grupo de animais soronegativos ($p < 0,49$).

6 DISCUSSÃO

A artrite encefalite caprina a vírus e a linfadenite caseosa são duas importantes afecções crônicas que acometem caprinos e são causadas por um lentivírus e pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, respectivamente. A interação dos agentes etiológicos com a resposta imune do hospedeiro tem sido objeto de muitos estudos, todavia, esta relação não está totalmente elucidada. Além disso, as duas doenças são estudadas isoladamente, bem como a interação bactéria e vírus. Assim, partindo-se do princípio que as duas doenças possuem agentes causais de espécies diferentes, mas que têm em comum tropismo pela mesma célula (LARA et al., 2005; CHIRINO-ZÁRRAGA et al., 2006) e que os estudos sobre as duas afecções são normalmente realizados de forma isolada, o presente trabalho teve o intuito de avaliar a função fagocítica *in vitro* de células da linhagem monócito-macrófago de animais infectados pelo VAEC utilizando-se da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* como desafio antigênico, baseando-se na hipótese de que essas células dos animais portadores do vírus tenham a função fagocítica comprometida ou alterada, predispondo os portadores à futuras infecções, inclusive à linfadenite caseosa.

A triagem dos animais, oriundos de três diferentes locais, frente ao VAEC permitiu observar que 48,75% dos animais triados eram portadores do vírus. Esse resultado não teve a pretensão de validar epidemiologicamente o achado, mas demonstrou que a doença é comum nos rebanhos e acompanhou os índices citados na literatura que afirmaram ser essa uma enfermidade presente mundialmente nos plantéis com altos índices de animais infectados, independente da raça, sexo e idade, sendo os rebanhos leiteiros os que apresentam uma maior prevalência da doença (CUTLIP et al., 1992; BELANGER; LEBOEUF, 1993; PINHEIRO et al., 2001; TORRES-ACOSTA et al., 2003, AL-QUDAH et al., 2006; GUFLER et al., 2007).

O teste eleito para identificação dos animais acometidos pelo vírus da AEC no presente estudo foi a imunodifusão em gel de ágar, o teste mais utilizado para detectar anticorpos anti-VAEC (LARA et al., 2003; CORTEZ-MOREIRA et al., 2005). Técnica preconizada pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE), para triagem e trânsito de animais, e pelo Código Internacional de Saúde Animal (“International Animal Health Code”), para importação e exportação dos animais, apresenta 100% de especificidade (ANDRÉS et al., 2005; CORTEZ-MOREIRA et al., 2005), entretanto, a sensibilidade deste teste é controversa, pois, há relatos na literatura de 70 % a 91% (ANDRÉS et al., 2005, BRINKHOF; VAN MAANEN, 2007).

Comparando-se a sensibilidade da IDGA ao teste ELISA, o segundo tem demonstrado maior sensibilidade que o primeiro, principalmente, nos casos de animais que apresentavam soroconversão tardia, todavia, o IDGA, pela sua especificidade, não aponta para resultados falso-positivos como o teste ELISA (ANDRÉS et al., 2005; CORTEZ-MOREIRA et al., 2005; BRINKHOF; VAN MAANEN, 2007).

Um estudo comparativo entre os testes PCR e IDGA demonstrou que o primeiro não tem a especificidade do segundo, sendo sugerido utilizá-lo como ferramenta auxiliar ao IDGA, uma vez que o resultado demonstrou que o PCR detectou um menor número de animais positivos, mas um maior número de animais negativos e (RUTKOSKI et al., 2001).

Como este estudo buscava avaliar a inter-relação entre duas importantes enfermidades que acometem os caprinos, procurou-se excluir a possibilidade de outras afecções através das avaliações das séries eritrocitária e leucocitária. Assim, o volume globular dos animais soropositivos quando comparados aos soronegativos não diferiram entre si, estando também dentro de padrões pré-estabelecidos para caprinos (FELDMAN et al., 2000). Da mesma forma se deu a contagem eritrocitária entre os animais dos distintos grupos, quando confrontados os resultados encontrados com os valores normais de referência citados na literatura, apresentando-se dentro da normalidade (FELDMAN et al., 2000; VIANA, 2001).

O quadro leucocitário não apresentou diferença significativa entre os grupos, todavia os valores foram superiores aos propostos por Feldman et al. (2000). Ao comparar os resultados com os valores de referência brasileiros, preconizados por Viana (2001), que analisou as diferentes fases da gestação e puerpério sobre o hemograma de caprinos da raça Saanen criados no Estado de São Paulo, as contagens absolutas e relativas das distintas populações leucocitárias encontraram-se dentro da amplitude para caprinos saudáveis. Estes dados podem representar um panorama mais próximo da realidade brasileira, podendo diferir em alguns aspectos dos parâmetros internacionais devido aos diferentes desafios antigênicos que os nossos animais são submetidos e às distintas condições de manejo sanitário e produtivo.

Uma vez estabelecidos os critérios de inclusão amostral deste trabalho, passou-se a considerar as características das técnicas escolhidas para avaliar a função fagocítica especificamente relacionada à *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

A quantidade de bactérias necessária para induzir a fagocitose que divergiu da relação (10:1 – bactéria células) utilizada por grande parte dos pesquisadores (KAPETANOVIC et al., 2007, RAJAVELU; DAS, 2007; WEISS et al., 2008). No entanto, outros trabalhos utilizaram menor concentração bacteriana por fagócito, em especial ao considerar estudos que utilizaram

Corynebacterium pseudotuberculosis ou outros actinomicetos numa proporção variando de 1 a 5 bactérias por célula (TASHJIAN; CAMPBELL, 1983; GOLLNICK et al., 2007; JORDAO et al., 2008).

Num primeiro momento, da presente pesquisa, buscou-se trabalhar com a relação 10:1, todavia, percebeu-se uma grande quantidade de debris celulares. Diminuindo-se essa relação e trabalhando-se com a quantidade de seis bactérias para uma célula mononuclear observou-se grande quantidade de fagócitos intactos em vários estágios de maturação, isto é, desde monócitos a macrófagos altamente reativos. Essa divergência da quantidade pode ser explicada, pelo fato de que os outros autores trabalharam com outras espécies animais e bacterianas.

A técnica de aderência de células da linhagem monócito-macrófago, utilizada no presente trabalho, mostrou-se eficiente para esse fim, todavia observou-se também a aderência de linfócitos. Esse dado é divergente na literatura compulsada, pois, Stabel et al. (1997) estudaram a função de monócitos de sangue periférico de bovinos, porém não descreveram a aderência de linfócitos. Contudo, Goddeeris et al. (1986), num estudo comparativo de diferentes técnicas de aderência de monócitos bovinos, descreveram que a técnica de separação de mononucleares pela aderência em placas de poliestireno resultou em apenas 60% de monócitos.

O tempo utilizado para adesão e fagocitose da bactéria permitiu observar vários estágios de maturação celular. Este dado permite afirmar que a bactéria como desafio antigênico, bem como a quantidade utilizada por célula e o tempo de incubação, foram capazes de induzir uma resposta imune dos fagócitos. Além disso, foi observado que diante do período de incubação utilizado não houve morte celular, corroborando com Tashjian e Campbell (1983) que observaram que *C. pseudotuberculosis* é capaz de sobreviver no interior dos fagócitos podendo ocasionar a morte dos mesmos. Ainda, a destruição dos macrófagos foi primeiro evidenciada no período de 1 a 4 horas das amostras, mas o dano generalizado não foi observada até o período de 8 horas. A destruição celular foi evidenciada pela grande quantidade de debris do material examinado, podendo ser devido à ação da endotoxina fosfolipase D produzida pela *C. pseudotuberculosis*. Esta bactéria é resistente à morte e digestão pelos macrófagos e essa resistência se dá provavelmente pela presença de uma camada lipídica na parede bacteriana, sendo esta também, um importante fator de virulência.

Baseando-se no estágio e na presença de fagocitose, buscou-se fazer a classificação das células, a saber: monócitos aderidos, monócitos fagocitando *C. pseudotuberculosis*, macrófagos aderidos, macrófagos espalhados e macrófagos fagocitando. Um dado não

esperado, mas observado no presente estudo foi a presença de duas classes distintas de fagocitose pelos macrófagos classificadas por + e ++. Para determinar essa classificação considerou-se o número de partículas dentro dos vacúolos celulares e observou-se que as células que ingeriam um menor número de bactérias, possuíam até doze partículas e por isso foram consideradas como fagocitose +. Os demais, geralmente fagocitavam um número incontável de bactérias engolfadas nos fagolisossomos, sendo classificados como fagocitose ++. Dessa forma, a divisão da fagocitose em distintos escores de acordo com o número de partículas foi fundamental para verificação da diferença entre a capacidade fagocítica dos distintos grupos. Uma heterogenicidade na capacidade fagocítica celular já foi descrita em outros estudos, sendo sugerido ainda que com a simples quantificação de fagócitos sem a avaliação da quantidade de partículas fagocitadas seria um dado de relevância restrita (RIVAS et al., 2002). Assim, o grupo fagocitose foi implementado pelo status da fagocitose, se tornando, portanto, fagocitose + (Figura 11) e fagocitose ++ (Figura 12).

A análise dos grupos experimentais permitiu observar três importantes fenômenos: primeiro, houve uma maior porcentagem de macrófagos com fagocitose ++ nas células obtidas do grupo de animais positivos no teste de anticorpos séricos antivírus da AEC quando comparadas às células do grupo de animais negativos à sorologia ($p = 0,001$) (Tabela 4 e Figura 15).

Segundo, houve uma maior porcentagem de macrófagos com fagocitose + nas células obtidas do grupo de animais soronegativos, quando comparadas às células obtidas no grupo de animais soropositivos ($p = 0,012$) (Tabela 4 e Figura 15).

Terceiro, houve uma correlação positiva no grupo dos animais positivos entre macrófagos fagocitando ++ com monócitos fagocitando ($r = 0,488$, $p = 0,006$) (Figura 16 e 17). Esta relação sugere uma maior capacidade fagocítica da série monócitos-macrófagos, independente do seu estado de maturação, porém outros autores relatam que os macrófagos derivados de monócitos são similares aos monócitos, apesar de exibirem uma maior capacidade fagocítica, sendo que a maturação dos monócitos para macrófagos podem aumentar a expressão de CR4 que contribui para fagocitose (MYONES et al., 1988; WOO et al., 2006). Ademais, é ainda proposto que a menor infecção dos monócitos pelo VAEC pode ser explicada em parte pelo menor número de receptores para o vírus ou até a ausência destes (GENDELMAN et al., 1986). É também citado que o VAEC pode alterar a responsividade da produção de citocinas pelos monócitos (WERLING et al., 1994) e que o mesmo pode alterar a habilidade destas células de agir de forma sinérgica com os linfócitos na indução da resposta

imune. Isto aponta que outros mecanismos podem estar envolvidos na regulação da resposta fagocítica destas células nos animais infectados pelo VAEC.

No entanto, a porcentagem total de macrófagos fagocitando (fagocitose ++ e fagocitose +), assim como a porcentagem total de células fagocitando (macrófagos e monócitos) não diferiu entre os grupos, o mesmo já citado na literatura (ANDERSON et al., 1983). Esse é um dado importante, o qual demonstra não haver diferença na quantidade de células realizando fagocitose, independente se o animal apresenta ou não anticorpos anti-VAEC, contudo a capacidade fagocítica variou, sendo que as células derivadas dos animais soropositivos demonstraram maior capacidade de fazer fagocitose quando comparada às células dos animais negativos.

Os fagócitos mononucleares apresentam papel fundamental na patogênese da infecção pelo *C. pseudotuberculosis*, fornecendo um nicho intracelular para sobrevivência e multiplicação desse coco-bacilo, ressaltando-se se tratar de um agente intracelular facultativo, o qual é rapidamente fagocitado por macrófagos; no entanto, mesmo com a formação do fagolisossomo a bactéria continua se multiplicando, levando a morte celular e liberação da bactéria e ocasionando posteriormente uma lesão necrótica (WALKER et al., 1994). A capacidade de *C. pseudotuberculosis* de sobreviver e proliferar dentro de macrófagos é também uma forma de disseminação pelo sistema linfático (BILLINGTON et al., 2002). Deve-se considerar, ainda, que o linfonodo é um importante reservatório para replicação de VAEC (RAVAZZOLO et al., 2006) e também um importante sítio de multiplicação para *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma vez que após infectados, os macrófagos seguem para os linfonodos que drenam a região a partir da lesão inicial (KURIA et al., 2001). A transcrição viral foi também vista em tecidos não inflamados em menor número que nos tecidos inflamados (ZINK et al., 1990). Destarte, é também reportado uma maior replicação viral em macrófagos que em monócitos (ANDERSON; ANDERSON, 1982; ANDERSON et al., 1983; ZINK; NARAYAN, 1989).

Ao verificar a patogenicidade de outros actinomicetos que apresentam grande similaridade com *Corynebacterium pseudotuberculosis*, observou-se semelhanças no mecanismo de escape do sistema imune. Estas similaridades entre esse grupo bacteriano é reforçada pela presença de antígenos da parede celular, os quais esses agentes possuem em comum, que podem, ainda, ocasionar resultados falso-positivos no teste de tuberculina nos animais infectados por *C. pseudotuberculosis* (WILLIAMSON, 2001).

Adicionalmente a isto, essas mesmas bactérias evadem do sistema imune pela interrupção da maturação do fagossomo para fagolisossomo e ainda evitam o

desenvolvimento de uma localizada resposta imune que pode ativar os macrófagos levando a destruição intracelular dos patógenos (MUELLER; PIETERS, 2006).

Além disso, a entrada deste grupo de bactérias nas células fagocíticas pode ser mediada por uma variedade de receptores que levam à sua entrada e liberação do microrganismo dentro do fagossomo da célula do hospedeiro (PIETERS, 2001; RUSSELL, 2001). Dentro do fagossomo as micobactérias retêm ou eliminam uma série de moléculas do hospedeiro, levando a prevenção da maturação do fagossomo em fagolisossomo. Entretanto, os mecanismos utilizados pela bactéria na modulação com intuito de bloquear a maturação dos fagossomos permanece não totalmente elucidado. Porém, evidências sugerem que certos eventos sinalizadores que normalmente acompanham a maturação do fagossomo estão inibidos ou modulados por essas bactérias intracelulares (PIETERS; MUELLER, 2006). Por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* secreta uma fosfatase lipídica que cliva o PI3P (Fosfatilinositol 3 fosfato) e bloqueia a fusão do fagossomo ao endossomo, em ensaios *in vitro*, desta forma contribuindo para inibição da maturação do fagossomo (VERGNE et al., 2005).

As micobactérias são capazes de bloquear a ativação de células T pelos macrófagos que pode estar correlacionado com a habilidade do bacilo de induzir a produção de citocinas como IL-1, IL-6 e FNT- α em níveis inibitórios dentro dos granulomas (VAN HEYNINIGEN et al., 1987). Entretanto, isto ocorre mesmo se micobactérias intracelulares minimizarem a capacidade dos macrófagos de induzir uma localizada resposta imune celular. A evasão desta resposta imune tardia pode ser, pelo menos em parte, devida a habilidade das micobactérias de produzir uma infecção anérgica dos macrófagos ativando citocinas como a IFN- γ que pode ser resultado dos componentes bacterianos que são expressos dentro da célula infectada (TING et al., 1999). Weiss et al. (2004) forneceram evidências do aumento da expressão de IL-10 em macrófagos derivados de monócitos infectados por *M. tuberculosis* e que a neutralização da IL-10 permitiu a digestão do *M. tuberculosis*.

Pelo supra descrito os resultados do presente estudo apontam para uma sugestão quanto a maior disseminação à linfadenite, pois, a maior quantidade de partículas bacterianas fagocitadas nos animais infectados pelo VAEC, poderia facilitar a disseminação da bactéria para outros tecidos e a formação de novos granulomas. No entanto, muitos estudos avaliaram a sobrevivência da *C. pseudotuberculosis* no interior dos macrófagos, porém deve-se considerar que a fase extracelular da infecção pelo *C. pseudotuberculosis* pode ser importante na transmissão desta bactéria entre células, em especial deve-se considerar também o envolvimento da resposta do hospedeiro frente a esta fase da infecção.

Congruente a isto, é citado que a forma pulmonar da infecção pela *Corynebacterium pseudotuberculosis* ocorre com mais frequência em ovinos infectados por lentivirose (GATES et al., 1977; BRODIE et al., 1992). É também reportado em humanos em que a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* é mais comum nos indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e que esta doença bacteriana pode acelerar a progressão desta última (ELLNER, 1990). Estas duas infecções parecem ter efeito sinérgico causando uma mudança a favor dos seus agentes etiológicos que não pode ser revertida pelo tratamento com agentes antimicobacterianos (WALLIS; ELLNER, 1994). Foi então sugerido que as infecções micobacterianas poderiam causar um aumento na produção de IL-6, a qual suprime a imunidade mediada por células. Deste modo, a IL-6 assim como a IL-1 e o FNT- α foram implicados na indução da replicação do HIV (VANHEYNINGEN et al., 1997). Destarte, sendo o VAEC pertencente à mesma família e ao mesmo gênero do HIV (QUINN et al., 2005) e a *C. pseudotuberculosis* um actinomiceto como o *Mycobacterium tuberculosis* (DORELLA et al., 2006), e suas similaridades na modulação da resposta imune, acredita-se que a progressão destas doenças também podem apresentar um efeito sinérgico entre si. Estudos também apontam que mediadores solúveis secretados na resposta frente a esta bactéria pode modular a replicação de lentivírus, e por extensão favorecer a progressão da doença em ovinos infectados por ambas as enfermidades (ELLIS et al., 1994). Apesar dos mediadores solúveis não terem sido analisados no presente estudo, a diferença manifesta quanto à intensidade da fagocitose nos animais com AEC, apontando para o mesmo raciocínio.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que a artrite encefalite caprina a vírus interfere na imunidade inata dos animais infectados pelo vírus, uma vez que foi observado aumento da intensidade de fagocitose dos macrófagos e aumento do número de monócitos fagocitando no grupo positivo, sugerindo que a AEC predispõe os animais à linfadenite caseosa.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J. L.; MCGUIRE, T. C.; GORHAM, J. R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 9, p. 1670-1675, 1983.
- ADAMS, D. S.; OLIVER, R. E.; AMEGHINO, E.; DEMARTINI, J. C.; VERWOERD, D. W.; HOUWERS, D. J.; WAGHELA, S.; GORHAM, J. R.; HYLLSETH, B.; DAWSON, M.; TRIGO, F. J.; MCGUIRE, T. C. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Record**, v. 115, n. 19, p. 493-495, 1984.
- ADLER, H.; FRECH, B.; THÖNY, M.; PFISTER, H.; PETERHANS, E.; JUNGI, T. W. Inducible nitric oxide synthase in cattle. Differential cytokine regulation of nitric oxide synthase in bovine and murine macrophages. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 9, p. 4710-4718, 1995.
- AL-QUDAH, K.; AL-MAJALI, A. M.; ISMAIL, Z. B. Epidemiological studies on caprine arthritis-encephalitis virus infection in Jordan. **Small Ruminant Research**, v. 66, n. 1-3, p. 181-186, 2006.
- ANDERSON, L. W.; KLEVJER-ANDERSON, P.; LIGGITIF, H. D. Susceptibility of blood-derived monocytes and macrophages to caprine arthritis-encephalitis virus. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 837-840, 1983.
- ANUALPEC 2006:** Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2006. 369 p.
- BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.
- BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit differential Innate Immune Responses following Intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 3, p. 463-472, 2004.
- BANKS, K. L.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C.; CARLSON, J. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 12, p. 2307-2311, 1983.
- BÉLANGER, D.; LEBOEUF, A. CAE virus prevalence in a mixed goat herd. **The Veterinary Records**, v. 133, n. 13, p. 328, 1993.
- BELLINGTON, S. J.; ESMAY, P. A.; SONGER, J. G.; JOST, B. H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 41-45, 2002.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. Sao Paulo: Melhoramentos, 1984, 23 ed., p. 930-931.

BRINKHOF, J.; VAN MAANEN, C. Evaluation of five enzymed-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1210-1214, 2007.

BRODIE, S. J.; MARCOM, H. A.; PEARSON, L. D.; ANDERSON, B. C.; DE A CONCHA-BREMEJILLO, A.; ELLIS, J. A.; DEMARTINI, J. C. The effect of virus load in the pathogenesis of lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. **Journal of Infectious Disease**, v. 166, n. 3, p. 531-541, 1992.

CALLADO, A. K. C.; de CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. 1. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2003. 256 p.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; COSTA, L. F. M.; PAULE, B. J. A.; VALE, V. L.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 88-93, 2003.

CETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; De BAERE, T.; VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 75-83, 2002.

CHAPLIN, P. J.; DE ROSE, R.; BOYLE, J. S.; McWALTERS, P.; KELLY, J.; TENNENT, J. M.; LEW, A. M.; SCHEERLINCK, J. P. Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6434-6438, 1999.

CHIRINO-ZÁRRAGA, C.; SCARAMELLI, A.; REY-VALEIRON, C. Bacteriological characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Venezuela goat flocks. **Small Ruminant Research**, v. 65, n. 1-2, p. 170-175, 2006.

COLOMBO, M. I.; BERON, W.; STAHL, P. D. Calmodulin regulates endosome fusion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 12, p. 7707-7712, 1997.

CORDEIRO, R. C. O Desenvolvimento econômico da caprinocultura leiteira. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 4, p. 28- 30, 1998.

CORTEZ-MOREIRA, M.; OELEMANN, M. R.; LILENBAUM, W. Comparison of serological methods for the diagnostic of caprine arthritis-encephalitis (CAE) in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 48-50, 2005.

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

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritisencephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 178, n. 7, p. 713-719, 1981.

CUTLIP, R. C.; JACKSON, T. A.; LAIRD, G. A. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n.7, p. 1081-1084, 1977.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; SACKS, J. M.; WEAVER, A. L. Prevalence of antibody to caprine arthritis encephalitis virus in goats in the United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 6, p. 802-805, 1992.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; VAN MAANEN, K.; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 167-175, 2000.

DESIDERIO, J. V.; TURILLO, L. A.; CAMPBELL, S. G. Serum proteins of normal goats and goats with caseous lymphadenitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 3, p. 400-402, 1979.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; MADEWELL, B. R.; FLOYD, K. Serological prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, n. 2, p.182-186, 1987.

EGGLETON, D. G.; MIDDLETON, H. D.; DOIDGE, D. G.; MINTY, D. W. Immunization against ovine caseous lymphadenitis: comparison with of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 10, p. 317-319, 1991.

ELLIS, J. A. Immunophenotype of pulmonary cellular infiltrates in sheep with visceral caseous lymphadenitis. **Veterinary Pathology**, v. 25, n. 5, p. 362-368, 1988.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; HOLLER, L. D.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Differential antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep with naturally acquired caseous lymphadenitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 10, p. 1609-1613, 1990.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous

lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 28, n. 3-4, p. 289-301, 1991.

ELLIS, J. A.; RUSSELL, H. I.; DU, C. W. Effect of selected cytokines on the replication of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and ovine lentiviruses in the pulmonary macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 40, n. 1, p. 31-47, 1994.

ELNER, J. J. Tuberculosis in the time of AIDS: the facts and the message. **Chest**, v. 98, n. 5, p. 1051-1052, 1990.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. 1344 p.

FERNANDES, M. A. **Artrite encefalite caprina: contribuição para o estudo epidemiológico em rebanhos leiteiros criados no Estado de São Paulo**. 1997. 70f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FLURI, A.; NENCI, C.; ZAHNO, M. L.; VOGT, H. R.; CHARAN, S.; BUSATO, A.; PANCINO, G.; PETERHANS, E.; OBEXER-RUFF, G.; BERTONI, G. The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. **Vaccine**, v. 24, n. 5, p. 597-606, 2006.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24, n. 33-34, p. 5986-5996, 2006.

GATES, N. L.; EVERSON, D. O.; HULET, C. V. Effects of thin ewe syndrome on reproductive efficiency. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 12, p. 1266-1267, 1977.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P. G. E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J. E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocyte to macrophages. **Journal of Virology**, v. 58, n. 1, p. 67-74, 1986.

GOLLNICK N. S.; MITCHELL R. M.; BAUMGART, M.; JANAGAMA, H. K.; SCREVATSAN, S.; SCHUKKEN, Y. H. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 120, n. 3, p. 93-105, 2007.

GORDON, S. The macrophage: past, present and the future. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. S9-17, 2007.

GREWAL, A. S.; GREENWOOD, P. L.; BURTON, R. W.; SMITH, J. E.; BATTY, E. M.; NORTH, R. Caprine retrovirus infection in New South Wales: virus isolations, clinical and histopathological findings and prevalence of antibody. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 7, p. 245-248, 1986.

GUFLER, H.; GASTEINER, D.; LOMBARDO, D.; STIFTER, E.; KRASSNIG, R.; BAUMGARTNER. Serological study of small ruminant lentivirus in goats in Italy. **Small Ruminant Research**, v. 73, n. 1-3, p. 169-173, 2007.

JOHNSON, E. H.; VIDAL, C. E. S.; SANTA ROSA, J.; KASS, P. H. Observations on goats experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Small Ruminant Research**, v. 12, n. 3, p. 357-369, 1993.

JORDAO, L.; BLECK, C. K. E.; MAYORGA, L.; GRIFFITHS, G.; ANES, E. On the Killing of micobacteria by macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 529-548, 2008.

KAPETANOVIC, R.; NAHORI, M. A.; BALLOY, V.; FITTING, C.; PHILPOTT, D. J.; CAVAILLON, J. M.; CONQUY, M. A. Contribution of phagocytosis by *Staphylococcus aureus* activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 830-837, 2007.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2003. 436 p.

KLEVJER-ANDERSON, P.; ANDERSON, L. W. Caprine arthritis-encephalitis virus infection of caprine monocytes. **Journal of General Virology**, v. 58, p. 195-198, 1982.

KLEVJER-ANDERSON, P.; ANDERSON, L. W.; LIGGITT, H. D. Susceptibility of blood-derived monocytes and macrophages to caprine arthritis-encephalitis virus. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 837-840, 1983.

KNOWLES JR, D. P. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 1997.

KNOWLES JR, D. P.; EVERMANN, J. F.; SHROPSHIRE, C.; VANDERSCHALIE, J.; BRADWAY, D.; GEZON, H. M.; CHEEVERS, W. E. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology use caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 243-245, 1994.

LAN, D. T. B.; TANIGUSHI, S.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T.; NAKANE, A. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 42, n. 12, p. 863-870, 1998.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; FERNANDES, M. A.; BIRGEL, E. H. Infecção experimental de vírus da artrite-encefalite dos caprinos em cabritos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 51-54, 2003.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E. H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 736-740, 2005.

LECHNER, F.; VOGT, H. R.; SEOW, H. F.; BERTONI, G.; CHEEVERS, W. P.; VON BODUNGEN, U.; ZUBRIGGEN, A.; PETERHANS, E. Expression of Cytokine mRNA in Lentivirus-Induced Arthritis. **American Journal of Veterinary Pathology**, v. 151, n. 4, p. 1053-1065, 1997.

LEITE, B. L. S.; MODOLO, J. R.; PADOVANI, C. R.; STACCHISSINI, A. V. M.; CASTRO, R. S.; SIMÕES, L. B. Avaliação da taxa de ocorrência artrite- encefalite caprina a vírus pelas regionais do Escritório de Defesa Agropecuária do estado de São Paulo, Brasil, e seu mapeamento por meio de sistema de informações geográficas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 1, p. 21-26, 2004.

LILENBAUM, W.; SOUZA, G. N.; RISTOW, P.; MOREIRA, M. C.; FRÁGUAS, S.; CARDOSO, V. S.; OELEMANN, W. M. R. A serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis–encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 2, p. 408-412, 2007.

MALIK, Z. A.; THOMPSON, C. R.; HASHIMI, S.; PORTER, B.; IYER, S. S.; KUSNER, D. J. Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca^{2+} signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 2811-2815, 2003.

McKEAN, S.; DAVIES, J.; MOORE, R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 13, p. 1352-1363, 2005.

McNAMARA, P. J.; BRADLEY, G. A.; SONGER, J. G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 921-930, 1994.

MENZIES, P. I.; HWANG, Y. T.; PRESCOTT, J. F. Comparison of an interferon- γ to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1-2, p. 129-137, 2004.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.; SCHAEER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 3-4, p. 249-254, 2005.

MUELLER, P.; PIETERS, J. Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic mycobacteria. **Immunobiology**, v. 211, n. 6-8, p. 549-556, 2006.

MYONES, B. L.; DALZELL, J. G.; HOGG, N.; ROSS, G. D. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 2, p. 640-651, 1988.

NARAYAN, O.; CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. **Review of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 89-98, 1985.

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

ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.

PANCHOLI, P.; MIRZA, A.; BHARDWAJ, N.; STEINMAN, R. M. Sequestration from immune CD4⁺ T cells of mycobacteria growing in human macrophage. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 984-986, 1993.

PATON, M. W.; MERCY, A. R.; WILKINSON, F. C.; GARDNER, J. J.; SUTHERLAND, S. S.; ELLIS, T. M. The effects of caseous lymphadenitis on wool production and bodyweight in young sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 4, p. 117-119, 1998.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C. R.; VALE, V. L. C.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAEER, R.; GOES, A. M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon γ production, IgG avidity and recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 3-4, p. 129-139, 2003.

PEPIN, M.; FONTAINE, J. J.; PARDON, P.; MARLY, J.; PARODI, A. L. Histopathology of the early phase during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Veterinary Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 123-134, 1991.

PEPIN, M.; SEOW, H. F.; CORNER, L.; ROTHEL, J. S.; HODGSON, A. L. M.; WOOD, P. R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Veterinary Research**, v. 28, n. 2, p. 149-163, 1997.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, n. 2, p. 211-226, 1981.

PIETERS, J., Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 3, p. 249-255, 2001.

PINHEIRO, R. P.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 449-454, 2001.

PLÜDEMANN, A.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. The interaction of macrophages receptors with bacterial ligands. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v. 8, n. 28, p. 1-25, 2006.

PRESCOTT, J. F.; MNZIES, P. I.; HWANG, Y-T. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 287-297, 2002.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 67-70.

RADOSTITIS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine. A text of the diseases of the cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 8. ed. London: Baillière Tindall, 1994. p. 652-655.

RAJAVELU, P.; DAS, S. D. A correlation between phagocytosis and apoptosis in THP -1 cells infected with prevalent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 2, p. 201-210, 2007.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C.; BARBOSA, P. G.; NARDI JUNIOR, G.; LISTONO, F. J. P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 23-28, 2001.

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

RIBEIRO, O. C.; SILVA, J. A. H.; PEREIRA FILHO, M. Incidência da linfadenite caseosa no semi-árido baiano. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 23-24, 1988.

RIVAS, A. L.; TADEVOSYAN, R.; QUIMBY, F. W.; COKSAYGAN, T.; LEIN, D. H. Identification of subpopulations of bovine mammary-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. **The**

Canadian Journal of Veterinary Research, v. 66, n. 3, p. 165-167, 2002.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 20, p. 329-335, 1947.

RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 569-577, 2001.

RUSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C.; BARBUTO, J. A. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 22, n. 10, p. 1271-1273, 1989.

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROLL, E. J. **Veterinary hematology**. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 807 p.

SENTURK, S.; TEMIZEL, M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. Short Communications. **The Veterinary Records**, v. 159, n. 7, p. 216-217, 2006.

SILVA, E. R.; ARAÚJO, A. M.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; SAUKA, T. N. Associação entre o California Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 46-48, 2001.

SIMMONS, C. P.; DUNSTAN, S. J.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; HODGSON, A. L. M.; STRUGNELL, R. A. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 474-479, 1998.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. (Ed.). Caprine arthritis encephalitis. **Goat Medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.73-79.

STABEL, J. R.; KEHRLI JR., M. E.; REINHARDT, T. A.; NONNECKE, B. J. Functional assessment of bovine monocytes isolated from peripheral blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 58, n. 2, p. 147-153, 1997.

TASHJIAN, J. J.; CAMPBELL, S. G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: An electron microscopic study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 4, p. 690-693, 1983.

TESORO-CRUZ, E.; GONZÁLEZ, R. H.; SCHMID, R. K.; SETIÉN, A. A. Cross reactivity between caprine arthritis-encephalitis virus and type-1 human immunodeficiency virus. **Archives of Medical Research**, v. 34, n. 5, p. 362-366, 2003.

TING, L. M.; KIM, A. C.; CATTAMANCHI, A.; ERNST, J. D. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3898-3906, 1999.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca. 2002. 532 p.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; GUTIERREZ-RUIZ, E. J.; BUTLER, V.; SCHMIDT, A.; EVANS, J.; BABINGTON, K.; BEARMAN, K.; FORDHAM, T.; BROWNLIE, T.; SCROER, S.; CAMARA, E.; LIGHTSEY, J. Serological survey of caprine arthritis – encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. **Small Ruminant Research**, v. 49, n. 2, p. 207-211, 2003.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 825-852, 2002.

VAN HEYNINGEN, T. K., COLLINS, H. L., RUSSELL, D. G. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 1, p. 330-337, 1997.

VERGNE, I.; CHUA, J.; LEE, H. H.; LUCAS, M.; BELISLE, J.; DERETIC, V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 4033-4038, 2005.

VIANA, R. B. **Influência da gestação, da parição e do puerpério sobre o hemograma de caprinos (*Capra hircus*) da raça Saanen, criados no Estado de São Paulo**. 2001. Falta total de folhas f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

WALKER, J.; JACKSON, H. J.; EGGLETON, D. G.; MEEUSEN, E. N. T.; WILSON, M. J.; BRANDON, M. R. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2562-2567, 1994.

WALLIS, R.; ELLNER, J. Cytokines and tuberculosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, n. 5, p. 676-681, 1994.

WEISS, D. J.; EVANSON, O. A.; DENG, M.; ABRAHAMSEN, M. S. Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. **Microbiology Pathology**, v. 37, n. 4, p. 215-224, 2004.

WEISS, D. J.; SOUZA, C. D.; EVANSON, O. A.; SANDERS, M.; RUTHERFORD, M. Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 48-55, 2008.

WERLING, D.; LANGHANS, W.; GEARY, N. Caprine arthritis-encephalitis virus infection changes caprine blood monocyte responsiveness to lypopolysaccharide stimulation *in vitro*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 43, n. 4, p. 401-411, 1993.

- WILKERSON, M. J.; DAVIS, W. C.; BASZLER, T. V.; CHEEVERS, W. P. Immunopathology of Chronic Lentivirus-Induced Arthritis. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 6, p. 1433-1443, 1995.
- WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 359-371, 2001.
- WOO, S. R.; SOTOS, J.; HART, A. P.; BARLETTA, R. G.; CZEPRYNSKI, C. J. Bovine monocytes and macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 1-3, p. 109-120, 2006.
- ZINK, M. C.; NARAYAN, O. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Virology**, v. 63, n. 6, p. 2578-2584, 1989.
- ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; MYERS, J. D. Pathogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. **American Journal of Pathology**, v. 136, n. 4, p. 843-854, 1990.