

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada

**Imunogenicidade de linhagens vacinais de
Salmonella enterica expressando a proteína VapA
de *Rhodococcus equi***

ALINE FERREIRA DE OLIVEIRA

Ribeirão Preto - SP
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALINE FERREIRA DE OLIVEIRA

**Imunogenicidade de linhagens vacinais de
Salmonella enterica expressando a proteína
VapA de *Rhodococcus equi***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica
e Aplicada.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Ribeirão Preto - SP

2008

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Aline Ferreira

Imunogenicidade de linhagens vacinais de *Salmonella enterica* expressando a proteína VapA de *Rhodococcus equi*.

Ribeirão Preto - SP, 2008. 135 p.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Roque-Barreira, Maria Cristina

1. *Rhodococcus equi* 2. *Salmonella enterica* 3. Vacinas

Lista de Abreviaturas:

APT_X: Antígeno total extraído da parede celular de *R. equi* - material rico em proteína VapA

BHI: Caldo de Cérebro e Coração

BSA: Albumina Sérica Bovina

ConA: Concanavalina A

DAP: Ácido Diaminopimélico

DO: Densidade Óptica

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imuno-enzimático)

GALT: Tecido Linfóide Associado ao Trato Gastrointestinal

H₂O₂: Peróxido de Oxigênio (água oxigenada)

IFN- γ : Interferon-gamma

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

LB: *Luria Broth*

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

MALT: Tecido Linfóide Associado a Mucosa

NK: Células *natural killer*

NO: Óxido Nítrico

PBS: Solução salina tamponada em fosfato

PBS-BSA: Solução salina tamponada em fosfato acrescida de albumina sérica bovina

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoride

***R. equi* ATCC33701**: Cepa virulenta de *Rhodococcus equi*

RPMI: Meio de cultura de células

TGF- β : Fator β de Crescimento e Transformação

Th: Linfócito T auxiliar

TLR: *Toll like receptor*

TMB: 3, 3', 5' tetrametilbenzidina

TNF: Fator de Necrose Tumoral

UFC: Unidade Formadora de Colônia

Vap: Proteína Associada à Virulência

ÍNDICE

Resumo.....	i	
Abstract.....	iv	
Introdução		
1) <i>Rhodococcus equi</i>		
1.1) Morfologia e identificação bioquímica de <i>R. equi</i>	01	
1.2) Características gerais de <i>R. equi</i>	01	
1.3) Mecanismos de virulência de <i>R. equi</i>	04	
1.4) Imunidade frente a <i>R. equi</i>	06	
1.5) <i>R. equi</i> e produção de citocinas.....	08	
1.6) <i>R. equi</i> e vacinas.....	10	
2) Vacinas de DNA.....		13
2.1) Vacinas de DNA vetorizadas.....	14	
2.1.1) <i>Salmonella</i> e vacinas.....	14	
2.1.2) Expressão de antígenos em linhagens vacinais de <i>S. enterica</i> Typhimurium.....	16	
2.1.2.1) Sistemas letais balanceados.....	17	
Objetivos.....	18	
Materiais e métodos		
1) Animais.....	19	
2) Linhagens bacterianas.....	19	
3) Cultivo e preparo de células de <i>S. enterica</i> Typhimurium contendo os plasmídios pYA3137 ou pYA3137vapA.....	19	
4) Imunização de camundongos com as linhagens vacinais de <i>S. enterica</i> Typhimurium.....	20	
5) Coleta e processamento de sangue para detecção de anticorpos séricos.....	20	
6) Coleta e processamento de material fecal para detecção de anticorpos de mucosa.....	21	
7) Obtenção da fração antigênica APTX		
7.1- Cultivo e preparo da cepa virulenta de <i>R. equi</i>	22	
7.2- Extração de antígenos da parede de <i>R. equi</i> virulento.....	23	
8) Atividade de APTX na ativação de macrófagos provenientes de camundongos vacinados		
8.1- Obtenção de macrófagos murinos e estimulação <i>in vitro</i>	23	
9) Obtenção, plaqueamento e estimulação de células esplênicas <i>in vitro</i>	24	
10) Dosagem de citocinas.....	25	
10.1- Dosagem de IL-12 (p40 / p70) e IL-1 β	25	
10.2- Dosagem de TNF- α	26	
10.3- Dosagem de IFN- γ	26	
10.4- Dosagem de IL-10.....	27	
10.5- Dosagem de IL-4.....	27	
11) Dosagem de óxido nítrico.....	28	
12) Infecção de camundongos com <i>R. equi</i> virulento		
12.1- Cultivo, preparo e obtenção de suspensões de <i>R. equi</i>	28	
12.2- Inoculação em camundongos.....	29	
13) Dosagem de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio nos órgãos de camundongos desafiados.....	29	
14) Dosagem de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	29	

15) Quantificação da expressão de RNAm de fatores de transcrição por PCR em Tempo Real....	30
15.1- Extração de RNA.....	30
15.2- Transcrição reversa (RT).....	31
15.3- PCR em Tempo Real.....	31
15.4- <i>Primers</i> utilizados na PCR em Tempo Real.....	32
16) Ensaio de proliferação celular frente ao antígeno APTX de <i>R. equi</i>	34
17) Análise das populações celulares presentes no baço de animais imunizados, desafiados ou não com <i>R. equi</i>	35
18) Análise dos resultados.....	35

Resultados

Parte I: ensaios realizados com animais vacinados e controles

1) Avaliação da resposta imune humoral: dosagem de IgG total, IgG1 e IgG2a séricas.....	36
2) Avaliação da resposta imune de mucosa: dosagem de IgA no material fecal.....	39
3) Produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos peritoneais.....	41
4) Produção de citocinas por células esplênicas.....	51

Parte II: ensaios realizados com animais vacinados e controles desafiados com *Rhodococcus equi* virulento

1) Detecção de citocinas em órgãos de camundongos desafiados com <i>R. equi</i>	63
2) Detecção de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio em órgãos de camundongos desafiados com <i>R. equi</i>	72

Parte III: ensaios realizados com animais vacinados e controles desafiados ou não com *Rhodococcus equi* virulento

1) Análise da produção de GATA e T-bet por PCR em tempo real.....	78
2) Proliferação de células esplênicas de camundongos vacinados e controles sob estímulo antígeno-específico.....	81
3) Avaliação das populações de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ presentes no baço de animais imunizados e desafiados com <i>R. equi</i>	83
4) Avaliação das populações de células B (CD19 ⁺) e T (CD3 ⁺) presentes no baço de animais imunizados e desafiados com <i>R. equi</i>	85
5) Avaliação das populações de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ presentes no baço de animais imunizados e desafiados com <i>R. equi</i>	87
6) Análise da produção de TGF- β e Foxp3 por PCR em tempo real.....	89

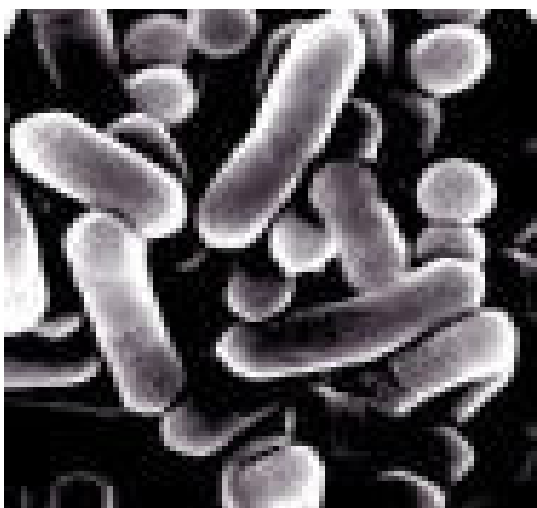
Discussão.....	91
----------------	----

Conclusões.....	107
-----------------	-----

Referências bibliográficas.....	108
---------------------------------	-----

Anexo.....	132
------------	-----

R E S U M E



RESUMO

Oliveira, A.F. **Imunogenicidade de linhagens vacinais de *Salmonella enterica* expressando a proteína VapA de *Rhodococcus equi***. 2008. 135 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A infecção de potros jovens e de humanos imunocomprometidos por *Rhodococcus equi* resulta em grave pneumonia. A antibioticoterapia nem sempre é eficaz, uma vez que há amostras de *R. equi* resistentes aos antibióticos convencionais (rifampicina / eritromicina). Além disso, o tratamento é longo, tem alto custo e diversos efeitos colaterais. Já foram desenvolvidos vários estudos com a finalidade de se obter vacinas efetivas contra a rodococose; entretanto, as estratégias de imunização ensaiadas não induziram efeito protetor considerável.

Uma vez que a proteína VapA, principal fator de virulência de *R. equi*, é dotada de alta imunogenicidade e linhagens atenuadas de *S. enterica* Typhimurium são boas carreadoras de proteínas heterólogas para células do sistema linfóide, nosso laboratório, com a colaboração do Dr. Marcelo Brocchi (Instituto de Biologia, UNICAMP), utilizou uma linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 para expressar a proteína VapA. A administração dessa linhagem em camundongos resultou em proteção contra a infecção por *R. equi*, manifesta por maior taxa de sobrevivência, maior *clearance* bacteriano e menor resposta inflamatória, em relação aos grupo inoculado somente com PBS ou com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 carreando apenas o plasmídeo pYA3137 (Oliveira *et al.*, 2007). Demonstrou-se assim que o procedimento de imunização oral com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium expressando VapA confere proteção frente a rodococose experimental, o que fundamenta a busca de se avaliar o padrão de resposta imune específica para *R. equi* desencadeado pelo processo de vacinação.

Camundongos vacinados produziram altos títulos de IgA de mucosa e de anticorpos séricos específicos, predominantemente do isotipo IgG2a. Suas células peritoneais, ao serem estimuladas *in vitro* com APTX (material rico em proteína VapA), produziram altos níveis de óxido nítrico, IL-12, TNF- α e IL-1 β . Além disso, suas células esplênicas secretaram maiores concentrações de IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-10. Em contrapartida, não se detectou IL-4 no sobrenadante dessas células. A maior produção de citocinas relacionadas ao padrão Th1 de resposta associou-se a uma maior expressão do fator de transcrição T-bet pelos camundongos vacinados, em comparação aos animais dos outros dois grupos.

Frente ao desafio com *R. equi* virulento, os animais imunizados produziram níveis maiores de IL-12, IFN- γ , IL-10 e de óxido nítrico em todos os órgãos analisados (pulmão, baço e fígado), embora menores concentrações de TNF- α e de IL-4 tenham sido verificadas.

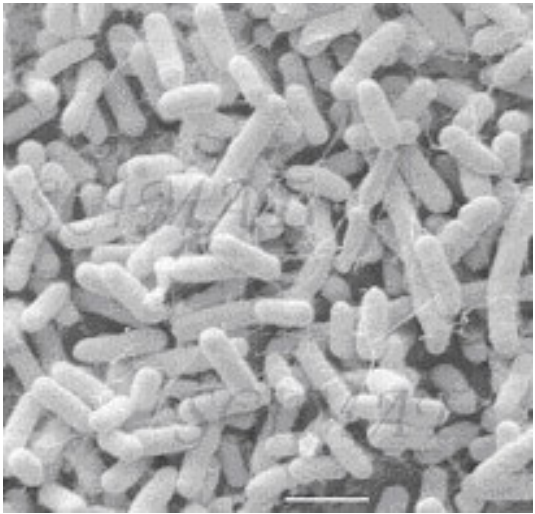
A análise das subpopulações celulares que participam na proteção de camundongos imunizados contra a infecção por *R. equi* revelou a ocorrência de números significativamente maiores de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B e células T CD4⁺CD25⁺. Além disso, esses animais apresentaram maior expressão de TGF- β e Foxp3, quando comparados aos animais dos dois grupos controles.

O estímulo com APTX de células esplênicas de animais vacinados resultou em significativa linfoproliferação.

Esse conjunto de resultados indica que a imunização com *S. enterica* Typhimurium expressando VapA gera imunidade específica humoral, celular e de mucosa. A resposta é predominantemente de padrão Th1 e capaz de conferir proteção contra a rodococose experimental. O aumento de células T CD4⁺CD25⁺, associado a maior expressão de Foxp3 e de TGF- β , e a produção aumentada de IL-10 e diminuída de TNF- α , detectados *in vivo*, podem ser

cruciais para a atenuação da reação inflamatória verificada nos órgãos de camundongos imunizados frente ao desafio com *R. equi*.

ABSTRACT



ABSTRACT

Oliveira, A.F. **Immunogenicity of vaccinal *Salmonella enterica* strain expressing the VapA protein of *Rhodococcus equi***. 2008. 135p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The infection of young foals and immunocompromised humans by *R. equi* results in severe pneumonia. The antibiotic therapy is not always effective, due to the resistance of some *R. equi* samples to the conventional antibiotics (rifampicin / eritromycin). Besides that, the treatment is prolonged, expensive, and it can result in undesirable effects. Several studies have been developed in order to obtain effective vaccines against rhodococcosis; however, the immunization strategies tested did not induce considerable protection.

Once it is known that the VapA protein, the main virulence factor of *R. equi*, is endowed of high immunogenicity, and that attenuated *S. enterica* Typhimurium strains are good carries of heterologous proteins for the lymphoid system cells, our laboratory, with the collaboration of Dr. Marcelo Brocchi (Institute of Biology, UNICAMP), used an attenuated *S. enterica* Typhimurium χ 3987 strain to express the VapA protein. The administration of this strain to mice resulted in protection against *R. equi* infection, as demonstrated by higher survival rates, higher bacterial clearance, and milder inflammatory response in comparison with the group inoculated with PBS or *S. enterica* Typhimurium χ 3987 carrying only the pYA3137 plasmid (Oliveira *et al.*, 2007). These results show that the oral mice immunization with attenuated *S. enterica* Typhimurium expressing the VapA protein confers protection against experimental rhodococcosis, and it justifies the purpose to evaluate the pattern of specific immune response to *R. equi* triggered by the vaccination process.

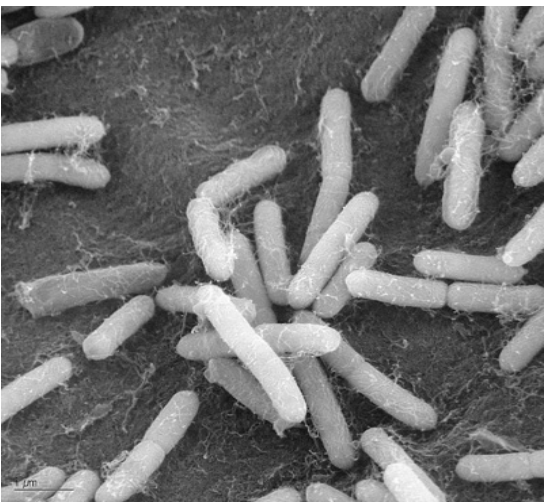
Vaccinated mice presented high titers of mucosal IgA and specific serum antibodies, especially from the IgG2a subclass. Peritoneal cells, after stimulation *in vitro* with APTX (rich in VapA protein), produced high levels of nitric oxide, IL-12, TNF- α and IL-1 β . Furthermore, their splenocytes secreted higher concentration of the TNF- α , IL-12, IFN- γ and IL-10. On the other hand, no IL-4 was detected in the supernatant of the cultures. The higher cytokines production related to the Th1 pattern of immune response was associated with higher expression of T-bet transcription factor by vaccinated mice, in comparison to the other two groups.

After challenge with virulent *R. equi*, immunized mice produced high levels of IL-12, IFN- γ , IL-10 and nitric oxide in all organs analyzed, whereas lower concentrations of TNF- α and IL-4 were detected.

The analysis of the subpopulation of cells that participate in the protection of immunized mice against *R. equi* infection showed that these animals presented higher numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, B lymphocytes, and CD4⁺CD25⁺ T cells. Besides that, these mice presented higher expression of Foxp3 and TGF- β , in relation to the control groups.

The stimulation, with APTX, of splenic cells from vaccinated animals resulted in significant lymph proliferation.

The set of results indicates that the immunization with *S. enterica* Typhimurium expressing the VapA protein induces specific humoral, cellular and mucosal immunity. The response is predominantly of Th1 pattern and able to confer protection against the experimental rhodococcosis. The increase in the CD4⁺CD25⁺ T cells, associated with higher expression of Foxp3 and TGF- β , and the increased production of IL-10 and decreased levels of TNF- α , detected *in vivo*, can be crucial for the attenuated inflammatory response observed in organs of immunized mice after challenge with *R. equi*.



INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1) *Rhodococcus equi*

1.1) Morfologia e identificação bioquímica de *R. equi*

Rhodococcus equi é um microorganismo gram-positivo, coco-bacilo difteróide encapsulado (cápsula polissacarídica) e parcialmente ácido resistente. Cresce bem em ágar sangue ou chocolate, suas colônias podem ser observadas após 48 horas de cultivo e são caracteristicamente mucóides, irregulares, convalescentes, apresentando coloração rósea-salmão. As colônias são caracterizadas bioquimicamente como: produtoras de catalase e urease; redutoras de nitratos; motilidade positiva; indol, bile-esculina, citrato e oxidase negativos; não produtoras de gelatinase; não fermentadoras de glicose, sacarose, lactose e manose (Votava *et al.*, 1997).

1.2) Características gerais de *R. equi*

R. equi foi inicialmente descrito como um patógeno veterinário, por causar pneumonia grave e / ou enterite, muitas vezes fatal, em potros de um a cinco meses de idade (Wilson, 1997). Hoje é também reconhecido como patógeno oportunista em humanos, causando uma pneumonia cavitária, muito similar a de equinos (Votava *et al.*, 1997), associada a AIDS em pacientes infectados pelo vírus HIV (revisto por Weinstock & Brown, 2002; Rozsypal *et al.*, 2007; Calista, 2008; Torres-Tortosa *et al.*, 2003). *R. equi* pode ser encontrado também em pacientes sob corticoterapia e quimioterapia, em indivíduos transplantados e naqueles com neoplasias (Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; revisto por Weinstock & Brown, 2002). Existem, inclusive, casos de infecção por *R. equi* em hospedeiros imunocompetentes (revisto por Kedlaya *et al.*, 2001; Obón *et al.*, 2007; Ulivieri *et al.*, 2006).

A infecção causada por *R. equi* nos indivíduos HIV positivos desenvolve-se de maneira severa, levando mais de um terço desses pacientes a óbito (Torres-Tortosa *et al.*, 2003),

alcançando um índice de mais de 50% de mortalidade (Cornish & Washington, 1999). Em indivíduos transplantados (Cronin *et al.*, 2008), pacientes com linfoma, insuficiência renal crônica, câncer de pulmão, leucemia, diabetes mellitus, alcoólatras e outros estados de imunodeficiência, a rodococose resulta em cerca de 20 a 25% de mortalidade e, em hospedeiros imunocompetentes, essa taxa varia em torno de 11% (Cornish & Washington, 1999).

Em humanos, a doença geralmente se apresenta como uma pneumonia necrosante (Rozsypal *et al.*, 2007), com abscessos pulmonares (Weinstock e Brown, 2002). A bactéria tem sido isolada praticamente de todos os tecidos ou fluídos do organismo (revisto por Weinstock e Brown, 2002) e, na maioria das vezes, pode ser diagnosticada incorretamente, ou não ser diagnosticada. O diagnóstico incorreto ocorre porque os microbiologistas classificam *R. equi* como um difteróide não patogênico para humanos e os clínicos desconhecem seu potencial patogênico (Doig *et al.*, 1991). Além disso, o diagnóstico de infecção por *R. equi* é dificultado devido ao crescimento lento do bacilo e as suas similaridades com outros microorganismos (Garthwaite *et al.*, 2007).

R. equi é um habitante do solo e aparentemente um microorganismo saprófita do intestino de herbívoros. Multiplica-se facilmente nos solos que recebem esterco de herbívoros o que explica o fato deste patógeno ser mais abundante nos lugares onde o homem cria cavalos por muitos anos (Wilson, 1997). Os potros infectados espalham constantemente grandes quantidades de *R. equi* virulento em suas fezes e são a principal fonte de contaminação em fazendas com história da doença (Takai, 1997), visto que *R. equi* é uma bactéria muito resistente a condições ambientais extremas, como baixo pH e estresse oxidativo (Benoit *et al.*, 2000 e 2002).

A distribuição de *R. equi* é muito variável e sua ocorrência em muitas fazendas pode se dar de forma endêmica ou esporádica; em outras fazendas pode nunca aparecer. Tal distribuição pode

ser explicada pelas diferenças na densidade de potros, manejo da fazenda e fatores ambientais como temperatura, empoeiramento e pH do solo (Meijer & Prescott, 2004).

A principal porta de entrada no hospedeiro são os pulmões e, às vezes, o trato alimentar ou a pele lesada (Votava *et al.*, 1997). *R. equi* pode ser isolado de aspirado traqueal de potros (Higuchi *et al.*, 1998), das fezes de cavalos (Takai *et al.*, 1995) e também do pulmão de potros que morrem de pneumonia pela bactéria (Madarame *et al.*, 1996).

Em potros, a infecção por *R. equi* resulta em broncopneumonia supurativa com abscessos pulmonares (Wilson, 1997). Histologicamente, as lesões pulmonares são de natureza granulomatosa, com macrófagos e células gigantes multinucleadas (Johnson *et al.*, 1983), refletindo a capacidade de *R. equi* de sobreviver no interior de macrófagos (Meijer & Prescott, 2004). A forma entérica de infecção pode cursar com ulceração intestinal e linfadenite mesentérica granulomatosa; frequentemente há manifestação de artrite purulenta (Takai *et al.*, 1994).

Um estudo estatístico de dez anos, realizado nos Estados Unidos, com potros acometidos de pneumonia por *R. equi*, sugere que a gravidade da doença clínica em potros atue negativamente sobre a taxa de sobrevivência e o desempenho dos animais (Ainsworth *et al.*, 1997).

A susceptibilidade de potros à infecção por *R. equi* parece ocorrer pela combinação de diversos fatores: a) exposição do sistema respiratório de potros a um grande número de *R. equi* através de aerossóis, especialmente no verão seco e empoeirado (Meijer & Prescott, 2004), b) declínio de imunidade passiva proveniente da mãe (Wilson, 1997), c) ausência de um mecanismo humoral (Ellenberger *et al.*, 1984) e celular (Kanaly *et al.*, 1993) competente em potros.

Segundo Varga *et al.*, (1997) as medidas mais importantes para o controle da pneumonia em potros causada por *R. equi* são: manejo adequado dos animais, higiene rigorosa, diagnóstico precoce da infecção, isolamento e tratamento dos potros doentes com antibióticos específicos.

1.3) Mecanismos de virulência de *R. equi*

A virulência de *R. equi* associa-se à sua capacidade de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos. Ainda que o parasitismo intracelular seja facultativo e haja susceptibilidade à morte mediada por neutrófilos, *R. equi* resiste à defesa macrofágica inata e estabelece residência no meio intracelular do fagócito (Hondalus, 1997), por inibir a acidificação do fagolisossomo (Toyooka *et al.*, 2005).

Os prováveis fatores de virulência de *R. equi* são: a) cápsula polissacarídica que inibe a fagocitose ou sua subsequente lise no interior de macrófagos, b) produção das enzimas fosfolipase C e colesterol oxidase, com ação membranolítica combinada que pode ser letal para macrófagos e outras células, c) ácidos micólicos da parede celular (Hondalus, 1997; Garton *et al.*, 2002), d) produtos codificados pelo plasmídio de virulência: 85-90 Kb (Hondalus, 1997).

Apesar de *R. equi* ter sido reconhecido como patógeno de potros desde 1923 (Magnusson, 1923), o estudo dos seus mecanismos de virulência só sofreu avanços importantes a partir da década de 90, com a descoberta dos plasmídios de virulência. Takai *et al.* (1993) demonstraram haver associação entre o plasmídio de virulência 85-90 Kb e antígenos de 15-17 kDa de *R. equi* virulento. Mostraram que cepas obtidas de lesões de potros compartilhavam as seguintes características: continham o plasmídio de 85-90 Kb, expressavam o antígeno de 15-17 kDa (denominado VapA) e eram virulentas para camundongos. Em contraposição, mutantes dessas cepas, que não expressavam esse antígeno, eram avirulentos.

Identificaram-se três níveis de virulência de *R. equi*. *R. equi* virulento, que expressa o antígeno de 15-17 kDa (VapA) codificado pelo plasmídio de virulência de 85-90 kb, responsável por causar grave pneumonia em potros; *R. equi* de virulência intermediária, que expressa o antígeno de 20 kDa (VapB) codificado pelo plasmídio de 79-100 kb; e *R. equi* avirulento, que

não expressa antígenos reconhecidamente associados à virulência (Wada *et al.*, 1997; Takai *et al.*, 1995 e 1996).

Jain *et al.* (2003) construíram um mutante de *R. equi*, no qual o gene *vapA* foi deletado. Demonstraram que essa bactéria mutada teve sua virulência atenuada, já que não se replicou em camundongos e foi rapidamente eliminada, em comparação com as cepas de *R. equi* selvagens. Além disso, *R. equi* mutante não se replicou no interior de macrófagos infectados *in vitro*. Assim, evidenciaram o papel da proteína VapA na virulência de *R. equi*.

Takai *et al.* (2000) verificaram que potros inoculados com 10^6 bactérias expressando VapB (antígeno de 20 kDa), de virulência intermediária, não manifestaram sinais clínicos de doença. No entanto, potros que receberam 10^6 bactérias expressando VapA (15-17 kDa) apresentaram graves manifestações clínicas de doença. Em estudo epidemiológico feito no Brasil, Ribeiro *et al.* (2005) encontraram plasmídio de virulência e gene *vapA* em 100% das amostras avaliadas, provenientes de animais acometidos por *R. equi*, reforçando a idéia de que a proteína VapA tenha importante papel na virulência da bactéria.

A análise dos plasmídios de virulência da cepa ATCC33701 de *R. equi*, denotou a presença de uma ilha de patogenicidade contendo sete genes associados à virulência, incluindo *vapA* (Takai *et al.*, 2000). Segundo os autores, esses genes *vap* tem extensa homologia com *vapA* e codificam proteínas termorreguladas. Os genes *vap* foram denominados *vapA*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapG* e *vapH*. Estudos sobre a expressão dos genes de *R. equi* demonstraram que apenas os genes da ilha de patogenicidade são diferencialmente transcritos, quando dentro de macrófagos equinos (Meijer & Prescott, 2004).

Ao avaliar a expressão dos diferentes genes *vap*, Takai *et al.* (1996) demonstraram que a máxima expressão de *vapA* ocorre à temperatura de 37°C e pH 6,5. Segundo Benoit *et al.* (2002),

a síntese da proteína VapA é muito aumentada em condições de estresse oxidativo, pela exposição da bactéria a H₂O₂.

1.4) Imunidade frente a *R. equi*

Em relação a imunidade humoral, anticorpos específicos podem bloquear o início da infecção celular, alterar a rota pela qual a bactéria entra no macrófago e / ou diminuir a habilidade da bactéria de inibir a acidificação do fagolisossomo (Speert, 1992; Toyooka *et al.*, 2005).

A literatura disponível sobre imunidade protetora frente a infecção por *R. equi* ainda é muito contraditória. Embora se atribua à imunidade celular um importante papel no combate à rodococose (Kanaly *et al.*, 1993), parece ser atribuível à imunidade humoral a proteção precoce de potros jovens (Ellenberger *et al.*, 1984). A administração de plasma hiperimune diminuiu a gravidade das lesões provocadas pela rodococose e retardou o aparecimento dos efeitos respiratórios induzidos pela pneumonia causada por *R. equi* (Caston *et al.*, 2006).

Foi demonstrado por Hooper *et al.* (2001) que a administração passiva de imunoglobulinas purificadas, provenientes de cavalos imunizados com VapA, protegeu potros contra o desafio experimental. Resultado semelhante foi obtido por Fernandez *et al.* (1997), que administrou a camundongos IgG anti-VapA de éguas vacinadas com antígeno enriquecido de VapA e constatou seu efeito protetor. Possivelmente esse efeito protetor associa-se à capacidade de anticorpos anti-VapA de opsonizar *R. equi* (Becu *et al.*, 1997; Hooper *et al.*, 2001). Contraditoriamente, verificou-se que a ingestão de colostro por potros nascidos de mães vacinadas não confere proteção contra *R. equi*. Essa falha, entretanto, pode se relacionar com a qualidade da vacina ou o isotipo de anticorpo gerado pela vacinação (Meijer & Prescott, 2004).

Em indivíduos não imunes, a ligação de *R. equi* a células de mamíferos é dependente do sistema complemento, pois o C3b opsonizante depositado na superfície bacteriana é reconhecido por Mac-1, receptor de complemento de macrófagos (Hondalus *et al.*, 1993).

Há vários relatos de que a proteção contra rodococose é dependente da ativação de células T, sendo mediada predominantemente pela produção de IFN- γ (Kanaly *et al.*, 1993; 1995 e 1996; Nordmann *et al.*, 1993). Camundongos imunodeficientes (NUDE e SCID) são susceptíveis à pneumonia rodocócica, por incapacidade de realizar o clearance de *R. equi* no pulmão (Yager *et al.*, 1991).

Nordmann *et al.* (1992) demonstraram que camundongos BALB/c depletados de linfócitos T CD4⁺ e / ou T CD8⁺, quando desafiados por via endovenosa com *R. equi*, apresentam aumento significativo do número de bactérias no baço e no fígado, em comparação a animais não depletados. Assim, os autores concluíram que tanto células T CD4⁺ como T CD8⁺ participam do clearance de *R. equi*.

Matsiota-Bernard *et al.* (1997) hiperimunizaram camundongos BALB/c com uma cepa de *R. equi* virulenta, mas não observaram expansão de uma subpopulação de células T em particular. No entanto, quando os linfócitos T esplênicos dos camundongos hiperimunizados foram cultivados na presença de bactérias mortas, ocorreu a proliferação de células T CD4⁺ e o aumento dos níveis de expressão do receptor de interleucina-2 (IL2R).

Ao desafiar cavalos por via intratraqueal, Hines *et al.* (2001) demonstraram que o clearance de *R. equi* no lavado-broncoalveolar (BALF) relaciona-se a uma intensa resposta linfoproliferativa, tanto de células T CD4⁺ como de células T CD8⁺, frente ao estímulo com antígenos solúveis de *R. equi* ou com a proteína VapA recombinante.

Há evidências de que a infecção de potros por *R. equi* resulte no desenvolvimento de uma ineficiente resposta imunitária de padrão Th2, acarretando a morte do hospedeiro. Os detalhes não são claros, mas é provável que a ilha de patogenicidade no plasmídeo de virulência interfira crucialmente na modulação da resposta do hospedeiro (Meijer & Prescott, 2004).

Martens *et al.* (2005) verificaram que neutrófilos são células importantes na defesa inata contra rodococose, pois a deficiência desse tipo celular resultou em aumento do número de bactérias nos órgãos de camundongos infectados, bem como em agravamento da doença.

1.5) *R. equi* e produção de citocinas

A imunidade mediada por linfócitos T auxiliares (T CD4⁺) representa um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro, uma vez que essas células orquestram a resposta imune através da produção de linfocinas. Após estimulação antigênica, linfócitos T CD4⁺ *naive* se diferenciam em células efetoras de tipo Th1, Th2 ou Th17, distinção feita com base no padrão de citocinas produzidas e suas funções efetoras (Bettelli *et al.*, 2007; Mosmann & Coffman, 1989).

Células Th1 produzem IFN- γ , IL-12 e IL-2 e promovem predominantemente a imunidade mediada por células, enquanto células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, promovendo forte resposta de anticorpos e inibição das atividades de macrófagos (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann & Coffman, 1989). Células Th17 produzem citocinas da família IL-17, relacionadas a vários processos inflamatórios. O desenvolvimento diferencial dessas subpopulações de células T CD4⁺ parece ser o determinante fisiológico, e mesmo patológico, das respostas imunes. De maneira simplista, pode-se dizer que respostas Th1 são responsáveis pela proteção contra patógenos intracelulares, respostas Th2 estão envolvidas na geração de subclasses de anticorpos apropriados, na eliminação de patógenos extracelulares e nas doenças alérgicas e, respostas Th17

parecem estar envolvidas na defesa contra patógenos que não foram eficientemente eliminados pelas respostas imunitárias Th1 e Th2 (Bettelli *et al.*, 2007; Afzali *et al.*, 2007).

Diversos estudos em camundongos têm confirmado que a imunidade celular exerce papel central na proteção contra *R. equi*. Kanaly *et al.* (1993 e 1996) demonstraram que camundongos BALB/c, ao serem infectados com *R. equi* virulento, desenvolveram resposta Th1 com progressivo controle da infecção. Quando essa resposta foi inibida, pelo uso de anticorpos anti-IFN- γ , os camundongos não controlaram a infecção e desenvolveram extensos granulomas pulmonares (Kanaly *et al.*, 1995). Estudo mais recente também responsabiliza a secreção de IFN- γ , associada à produção de anticorpos opsonizantes, pela proteção desenvolvida em equinos (Lopez *et al.*, 2002).

Cavalos adultos desafiados com *R. equi* virulento realizam eficiente *clearance* pulmonar e apresentam um aumento do número de células T CD4⁺ e T CD8⁺, produtoras de IFN- γ (Hines *et al.*, 2003). Breathnach *et al.* (2006) verificaram que potros recém-nascidos são incapazes de produzir IFN- γ . No entanto, a expressão gênica e a produção dessa citocina aumentam gradualmente durante os 6 primeiros meses de vida, atingindo níveis semelhantes aos de cavalos adultos após 1 ano de vida. Assim, os autores sugerem que essa incapacidade de potros recém-nascidos em montar resposta imune celular Th1 eficiente possa ser responsável pela maior susceptibilidade a patógenos intracelulares, como *R. equi*. Contraditoriamente, observações feitas por Jacks *et al.* (2007a) indicam que potros infectados com *R. equi* virulento são capazes de montar respostas linfoproliferativas e secretar IFN- γ da mesma maneira que os cavalos adultos. Isso porque o desafio intrabronquial de potros com *R. equi* virulento resultou em menor expressão de RNAm para IL-4 e maior expressão de RNAm para IFN- γ em linfócitos, em comparação a cavalos adultos (Jacks *et al.*, 2007b).

A infecção experimental intrabronquial em potros (18 a 23 dias de idade), utilizando em um grupo de animais a cepa virulenta (103⁺) e em outro grupo a cepa avirulenta de *R. equi* (103⁻), causou, em ambos os grupos, expressão similar de RNAm para IFN- γ e IL-12p35; já os potros infectados com a cepa 103⁺ apresentaram aumento significativo na expressão de RNAm para IL-1 β , IL-10, IL12p40 e TNF- α nos tecidos pulmonares (Giguere *et al.*, 1999a).

A produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α é extremamente importante no combate a rodococose, pois tanto as citocinas como NO estão envolvidos nos mecanismos de defesa inata contra a infecção (Darrah *et al.*, 2000 e 2004). Em relação à imunidade adaptativa, IL-12 é responsável pela diferenciação e ativação de células T *naives* em células T CD4⁺ efectoras, que passam a secretar IL-2, IFN- γ e linfotoxinas. Além de aumentar a capacidade microbicida de macrófagos, IFN- γ também ativa células T CD8⁺, importantes na proteção contra *R. equi*. Essas células promovem o *clearance* bacteriano por citotoxicidade direta da célula infectada e, pela secreção de citocinas.

Darrah *et al.* (2004) demonstraram que a infecção de macrófagos por *R. equi* ocorre através da interação da bactéria com *toll like receptor 2* (TLR2), seguida de rápida translocação do NF- κ B para o núcleo e da produção de NO e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12. Verificaram, ainda, que a proteína VapA purificada interage com TLR2, induzindo a maturação de células dendríticas e a produção de citocinas por macrófagos.

1.6) *R. equi* e vacinas

Vários autores preconizam que se previna a rodococose em potros pela administração de soro ou plasma hiperimune (Madigan *et al.*, 1991; Muller & Madigan, 1992; Becú *et al.*, 1997),

além da imunização ativa de éguas (Madigan *et al.*, 1991) ou de potros (Prescott *et al.*, 1997) com preparações vacinais, que ainda são experimentais.

A avaliação de dois tipos de vacinas anti-*R. equi*, sendo uma importada da Argentina (Rhodovac R) e outra produzida no Brasil (Rhodovac G), mostrou que éguas vacinadas com Rhodovac R tiveram melhor resposta imune humoral do que as vacinadas com Rhodovac G. Entretanto, dentre os potros nascidos de éguas vacinadas com Rhodovac R, apenas 50% tiveram títulos detectáveis de anticorpos específicos após ingerirem o colostro (Luciana Colbachini Ferraz, comunicação pessoal).

Prescott *et al.* (1997) ao imunizarem éguas e potros com o antígeno APTX obtiveram altos títulos de anticorpos nas mães e uma resposta imune humoral pobre em potros. A resposta pobre em potros foi atribuída à falta de um mecanismo humoral competente. Segundo Becú (comunicação pessoal - Luciana C. Ferraz, 1998), o procedimento de vacinação de potros utilizada por Prescott *et al.* (1997) pode ser equivocado, pois, a vacinação de éguas leva à transferência passiva de imunidade através do colostro, que bloquearia a própria imunidade ativa dos potros, desencadeada pela vacina; o autor preconiza que se vacinem apenas éguas, ou apenas potros. Além disso, Becú acredita que o esquema de vacinação utilizado por Prescott *et al.* (1997), em potros com 20, 30 e 40 dias de idade, também não seja adequado, postulando que a vacinação de potros seja procedida aos 7 e 21 dias de idade. Essa vacinação possibilitaria que os animais desenvolvessem imunidade celular numa fase mais precoce, gerando, supostamente, melhores resultados.

Resultados preliminares de nosso grupo demonstraram que a proteína VapA não é detectada na preparação de antígenos do Kit Rhododiagnos (KR), importado da Argentina. Resultado similar foi obtido por Fontanals *et al.* (1997) ao estudar a preparação de antígenos da vacina Rhodovac R. A preparação KR é a mesma utilizada em procedimentos vacinais, diferindo

apenas quanto à associação de adjuvante à preparação. Nosso grupo realizou um estudo comparativo entre o efeito protetor desencadeado pelo processo de imunização com a preparação APTX (material rico em VapA) e com o KR (VapA ausente), em camundongos BALB/c. Para tanto, animais foram previamente tratados com preparações de antígeno APTX ou de KR. Após 25 dias, foram infectados com *R. equi* virulento. Observamos haver aumento do *clearance* hepático de *R. equi* por camundongos imunizados com APTX, em relação ao grupo controle. Como o antígeno APTX é constituído essencialmente da proteína VapA, inferimos que VapA corresponda a um importante imunógeno na indução de proteção contra a rodococose.

Giguère *et al.* (1999b) realizaram experimentos de infecção intrabronquial *in vivo*, em camundongos BALB/c e potros, com a cepa avirulenta de *R. equi* expressando VapA recombinante. Verificaram que a expressão apenas de VapA, sem qualquer outro produto codificado pelo plasmídeo de 85 kb, não permitiu recuperar o fenótipo de virulência, pois, em ensaios *in vitro*, a bactéria perdeu a capacidade de sobreviver e de se replicar no interior de macrófagos. Em infecções experimentais *in vivo*, não houve aumento da virulência da cepa originalmente avirulenta.

Hines *et al.* (2001) realizaram infecção experimental em cavalos adultos, por via intranasal, com *R. equi* virulento. Verificaram que as células provenientes do lavado broncoalveolar exibiam intensa resposta proliferativa frente ao estímulo com o antígeno VapAr (*in vitro*). O reconhecimento de VapA por células T pulmonares representa, segundo os autores, um estímulo ao investimento de esforços na realização de ensaios utilizando VapA como imunógeno.

Diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de avaliar o poder imunogênico da proteína VapA e com isso determinar uma possível utilização vacinal (Fernandez *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2002 e 2003). Haghghi & Prescott (2005) demonstraram, pela primeira vez, que camundongos imunizados com vacina de DNA expressando a proteína VapA, apresentaram

aumento da imunidade diante da infecção com *R. equi*, proporcionada por uma resposta de padrão Th1.

A administração endovenosa de uma linhagem viva atenuada de *R. equi* protegeu camundongos BALB/c da infecção com a cepa virulenta, fato evidenciado pela menor recuperação bacteriana e aumento na produção de IFN- γ . No entanto, esse efeito protetor não foi reproduzido pela imunização intratraqueal de potros (Lopez *et al.*, 2008).

2) Vacinas de DNA

A vacinação constitui a melhor ferramenta de saúde pública para profilaxia de doenças infecciosas (Jain & Makalanos, 2000; Levine *et al.*, 1983; Medina *et al.*, 1999). O objetivo fundamental das vacinas é promover a imunização prévia do indivíduo, de modo que ele passe a responder de forma rápida e eficiente quando em contato com os agentes infecciosos, evitando-se a ocorrência da infecção e / ou evolução da doença. Diversas estratégias são empregadas no desenvolvimento de vacinas. Na última década, foram otimizadas novas formas de obtenção, produção, administração e apresentação de antígenos a células do sistema imune. Essas estratégias abriram caminho para inovações, particularmente no contexto de desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre elas, estão as vacinas de subunidade, consideradas de segunda geração, constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais, sintéticas ou mesmo recombinantes (Hubbard *et al.*, 1992). Mais recentemente, surgiram as vacinas gênicas ou de terceira geração, onde os genes ou fragmentos, que codificam antígenos imunodominantes são inseridos em vetores de DNA conhecidos como plasmídios.

Os plasmídios possuem sequências de DNA necessárias para seleção e replicação em bactérias, promotores especiais para transcrição, genes que conferem resistência a antibióticos

para seleção das bactérias transformadas e sequências específicas que permitem a expressão gênica em células eucarióticas ou procarióticas.

2.1) Vacinas de DNA Vetorizadas

A necessidade de vetorizar o DNA se derivou da constatação de que o DNA *nu*, inoculado por via intramuscular, é degradado por efeito de desoxirribonucleases extracelulares (Kawabata *et al.*, 1995; Lew *et al.*, 1995). Com a finalidade de proteger o DNA da degradação e otimizar o seu uso vacinal, foram desenvolvidos métodos de transporte desse DNA plasmidial. Dentre eles, destaca-se a utilização de linhagens bacterianas atenuadas, como *Shigella flexneri* (Sizemore *et al.*, 1995 e 1997) e *Salmonella enterica* Typhimurium (Darji *et al.*, 1997; Paglia *et al.*, 1998; Shata *et al.*, 2000), utilizados como carreadores de plasmídios contendo genes heterólogos.

Microrganismos atenuados recombinantes são carreadores vantajosos, já que sua obtenção é relativamente simples, seu custo de produção é baixo e seu emprego em vacinações de larga escala é adequado (Kotton & Hohmann, 2004).

2.1.1) *Salmonella* e vacinas

O interesse no uso de linhagens de *Salmonella* para o desenvolvimento de vacinas vetorizadas se dá por serem bons carreadores de antígenos heterólogos para o sistema imune de mamíferos (Mollenkopf *et al.*, 2001; Garmory *et al.*, 2002), devido a sua capacidade de colonizar o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e de invadir órgãos e tecidos mais profundos, induzindo resposta imunitária específica – humoral, celular e de mucosa (Kauffmann *et al.*, 2001; Dougan *et al.*, 1987; Chatfield *et al.*, 1994; Pascual *et al.*, 1997; Sirard *et al.*, 1999), sem causar lesões no hospedeiro (Hormaeche, 1991; Guillobel *et al.*, 2000; Hoiseth & Stocker, 1981;

Cárdenas *et al.*, 1994; Chatfield *et al.*, 1992). Conseqüentemente, *Salmonella* tem sido considerado o vetor mais adequado para utilização vacinal (Kotton & Hohmann, 2004).

Após procedimentos de infecção ou de imunização com *Salmonella*, a resposta imunitária humoral é suscitada pelo lipopolissacáride bacteriano. Já a resposta celular, principalmente de linfócitos T CD4⁺, é desencadeada por antígenos flagelares (Fierer & Guiney, 2001).

A infecção de células apresentadoras de antígenos com *S. enterica* Typhimurium resultou em secreção de citocinas pró-inflamatórias, produção de óxido nítrico, aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias e apresentação de antígenos derivados de *Salmonella* às células T CD4⁺ (Kalupahana *et al.*, 2005). Além disso, *Salmonella* induz a produção de altos níveis de IFN- γ por essas células, contribuindo para a ativação das respostas efetoras do hospedeiro (Pietilä *et al.*, 2005).

Após administração oral, linhagens de *S. enterica* aderem e invadem células da mucosa intestinal, preferencialmente células M, e atingem os sítios linfóides das placas de Peyer (PP) (Jones *et al.*, 1994; Carter & Collins, 1974; Huang *et al.*, 2000). Nesses sítios, *S. enterica* é capaz de persistir e replicar-se, servindo como fonte constante de antígenos que induzem resposta imune (Clarck *et al.*, 2000 e 2001; Gebert, 1997; Jepson & Clarck, 2001; Kraehenbuhl & Neutra, 2000). A bactéria frequentemente reside em macrófagos (Eckmann & Kagnoff, 2001), não apenas nas PP do GALT, mas também em órgãos como baço, fígado e linfonodos regionais. Induz, portanto, intensa resposta imune sistêmica (Huang *et al.*, 2000). Uma vez dentro de macrófagos, *S. enterica* Typhimurium leva a célula à morte ou ao estabelecimento de um nicho no interior do vacúolo fagocítico (Monack *et al.*, 2001).

Linhagens virulentas de *S. enterica* podem ser atenuadas através de mutações em genes necessários à sobrevivência e crescimento *in vivo*. Algumas mutações atenuam a virulência de *S.*

enterica, mas não impedem que a bactéria cause infecção transitória, sem gravidade, capaz de ativar o sistema imunológico (Cárdenas & Clements, 1992). Desde a década de 80, linhagens de *S. enterica* geneticamente modificadas, que possuem mutações definidas estáveis, têm sido testadas como vacinas orais e nasais em várias espécies animais (Nardelli-Haefliger *et al.*, 2001; Cong *et al.*, 2005; Chatfield *et al.*, 1992; Mielcarek *et al.*, 2001), inclusive em humanos (Hackett, 1993; Newton *et al.*, 1995).

Yang *et al.* (2007) demonstraram que a imunização oral, utilizando uma linhagem atenuada de *Salmonella* Typhimurium expressando simultaneamente os antígenos heterólogos F1 e V de *Yersinia pestis*, protegeu camundongos contra a peste bubônica e pneumocítica.

2.1.2) Expressão de antígenos em linhagens vacinais de *S. enterica* Typhimurium

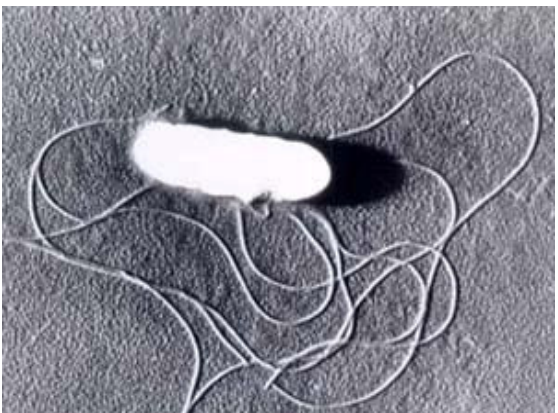
Geralmente, a clonagem e expressão de antígenos heterólogos em *S. enterica* é alcançada através da utilização de plasmídios carregando genes de resistência a antibióticos. No entanto, alguns estudos demonstraram que, na ausência de pressão seletiva, tais plasmídios são instáveis e, portanto, são perdidos após poucos ciclos de replicação ou até mesmo durante o cultivo *in vitro* (Cardenas & Clements, 1992). A expressão não regulada de altos níveis de proteínas heterólogas na célula bacteriana, a partir de plasmídios com múltiplas cópias, frequentemente resulta na rápida perda dos mesmos e de sua expressão (Chatfield *et al.*, 1992). As eventuais perdas do plasmídio e da capacidade de sintetizar o antígeno heterólogo constituem causas de falha ou de baixa indução de imunidade contra o antígeno em questão.

Com a finalidade de resolver tais problemas de instabilidade, são empregadas algumas estratégias, dentre elas a construção e utilização de sistemas letais balanceados.

2.1.2.1) Sistemas letais balanceados

Inicialmente é feita a deleção de um gene essencial à sobrevivência bacteriana, a fim de viabilizar tais sistemas. Em seguida, essa deleção é complementada pela introdução de um plasmídeo que, além de conter o gene deletado, contém ainda o gene codificador de uma proteína heteróloga (antígeno vacinal). O exemplo mais conhecido é representado pelo sistema Asd (Galán *et al.*, 1990). A deleção do gene *asd*, no cromossomo bacteriano, acarreta auxotrofia para o ácido diaminopimélico (DAP), um aminoácido importante na constituição da parede celular de bactérias gram-negativas. Na ausência de DAP, mutantes de *S. enterica* auxotróficos para esse D-aminoácido rompem-se após poucos ciclos de replicação. Assim sendo, plasmídios *asd* positivos contendo os genes heterólogos são utilizados para transformar células de *Salmonella* Δasd . Animais imunizados com tais linhagens recombinantes são colonizados somente por bactérias contendo o plasmídeo e, portanto, expressando o antígeno heterólogo. Covone *et al.* (1998) demonstraram a efetividade desse sistema para a expressão de um mutante não tóxico da toxina termo-lábil de *Escherichia coli* em linhagens $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ de *S. enterica* Typhimurium. Tal estudo demonstrou que as linhagens transformadas foram efetivas na geração de imunidade contra a proteína carreada.

O B J E T I V O



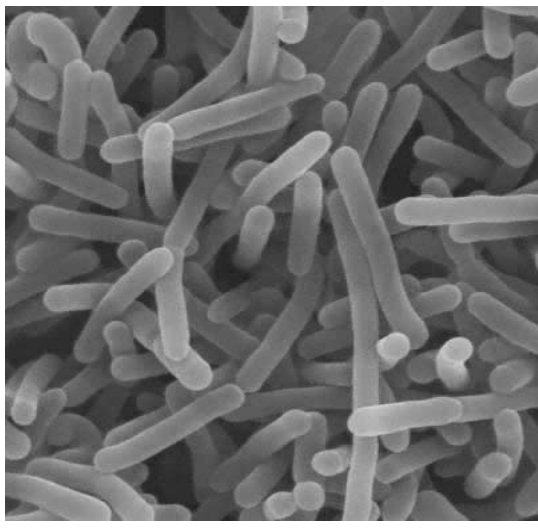
OBJETIVO

Buscou-se avaliar o padrão de resposta imune, específica para *R. equi*, desencadeada pela vacinação de camundongos com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 expressando a proteína VapA. Para tanto, as seguintes etapas de trabalho foram delineadas:

1. Detecção e isotipagem de anticorpos no soro (IgG total, IgG1 e IgG2a) e nas fezes (IgA) de camundongos vacinados e de camundongos controles;
2. Quantificação de citocinas e óxido nítrico produzidos por macrófagos peritoneais e células esplênicas de camundongos vacinados e de animais controles, após diferentes períodos de incubação na presença de APTX;
3. Detecção da produção de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio nos órgãos de camundongos vacinados e de camundongos controles, após desafio com *R. equi*;
4. Avaliação da expressão relativa de fatores de transcrição relacionados a uma resposta imunitária de padrão Th1 (T-bet) e Th2 (GATA-3);
5. Avaliação da resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos vacinados e controles, desafiados ou não com *R. equi*, frente ao estímulo com APTX;
6. Análise das populações celulares (linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B e células T CD4⁺CD25⁺) presentes no baço de animais vacinados e controles, desafiados ou não com *R. equi*;
7. Avaliação da expressão relativa do fator de transcrição Foxp3 e da citocina TGF- β .

M
A
T
E
R
I
A
I
S
E

M
É
T
O
D
O
S



MATERIAIS E MÉTODOS

1) Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas isogênicos, entre 6 e 8 semanas de idade, da linhagem BALB/c, provenientes do biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).

2) Linhagens bacterianas

Por motivo de simplificação para descrever *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovariedade Typhimurium foi utilizada a nomenclatura *S. enterica* Typhimurium.

Em todos os ensaios de imunização foi utilizada a seguinte linhagem bacteriana: *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 transformada com o plasmídio pYA3137vapA ou pYA3137.

Durante todo o trabalho, camundongos imunizados com *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA foram denominados como vacinados e, animais inoculados com *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS, como controles.

A cepa virulenta de *R. equi* ATCC33701 foi utilizada para desafio dos camundongos.

3) Cultivo e preparo de células de *S. enterica* Typhimurium contendo os plasmídios pYA3137 ou pYA3137vapA

O cultivo e preparo das células recombinantes foram realizados conforme descrito por Covone *et al.* (1998). Resumidamente, as linhagens de *S. enterica* Typhimurium contendo os plasmídios pYA3137 ou pYA3137vapA foram inoculadas em 10 mL de LB modificado (Acumedia) (LB acrescido de glicose na concentração de 0,1%) e incubadas sem agitação, por 12 horas a 37°C. A seguir, 700 μ L de cada cultura foram transferidos para 20 mL de meio LB modificado. Estas

novas culturas foram incubadas a 37°C sob agitação constante (200 rpm) até atingir a densidade óptica (DO) de 0,7 a um comprimento de onda de 600 nm. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 g, os sobrenadantes desprezados e as células ressuspensas em 20 mL de PBS (procedimento repetido duas vezes). Foram feitas diluições seriadas da última ressuspensão e as diluições dos tubos 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} foram plaqueadas em triplicata em ágar MacConkey para determinar o número de colônias (UFC / mL) na cultura a ser utilizada para inoculação e / ou imunização de camundongos.

4) Imunização de camundongos com as linhagens vacinais de *S. enterica* Typhimurium

Para o processo de imunização foram formados três grupos experimentais de camundongos BALB/c. No grupo I os animais foram imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 contendo o plasmídeo pYA3137vapA (grupo teste), no grupo II, os camundongos receberam *S. enterica* Typhimurium χ 3987 contendo somente o plasmídeo pYA3137 e no grupo III, os animais receberam apenas PBS. Os camundongos foram inoculados com 200 μ L das suspensões bacterianas (cerca de 1×10^9 UFC) por via oral; foram feitas duas imunizações com intervalo de 14 dias.

5) Coleta e processamento de sangue para detecção de anticorpos séricos

A coleta de sangue foi feita antes da primeira imunização para obtenção de soro pré-imune e após a segunda imunização em intervalos de 7 dias, num total de 6 semanas, para obtenção de soro imune (teste). Em cada ponto de amostragem foram coletados soros de 4 camundongos por grupo experimental. A coleta foi realizada por via intra-ocular e obteve-se aproximadamente 500 μ L de sangue de cada animal. O soro foi obtido através da centrifugação do sangue total por 15 minutos a 1000 g, sendo então armazenado a -20°C, para posterior determinação do título de anticorpos.

O ensaio de ELISA foi realizado para detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a, específicos para os antígenos de *R. equi*, no soro de camundongos imunizados.

Para tanto, placas de poliestireno de 96 poços (NUNC, Inc. Naperville USA) foram incubadas com a preparação antigênica APTX (descrito no item 7), na concentração final de 1 µg. A diluição foi feita em tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,6 (100 µL / poço). Após 24 horas de incubação a 4°C, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T / Sigma) e incubadas com 200 µL / poço de solução de bloqueio (PBS-T contendo gelatina a 3%) por 1 hora a 37°C. A seguir, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL das amostras dos soros em diferentes diluições (1:30 a 1:480) na solução de bloqueio (PBS-T-gelatina 1%), por 2 horas a 37°C. Após 5 lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com anticorpos de cabra anti-IgG total, anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo, conjugados à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), diluídos 1:5000 em PBS-T-gelatina 1%. Após 1 hora de incubação a 37°C, os poços foram novamente lavados, sendo a reação antígeno-anticorpo revelada pela adição de 100 µL / poço de tetrametilbenzidina (TMB / Pierce), na concentração sugerida pelo fabricante. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2 M (Merck) e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC).

6) Coleta e processamento de material fecal para detecção de anticorpos de mucosa

A coleta de fezes foi feita após a segunda imunização em intervalos de 7 dias, num total de 6 semanas. Em cada ponto de amostragem, foi coletado material de 4 camundongos. Imediatamente após a coleta, o material fecal obtido de cada animal foi transferido isoladamente para tubos de microcentrífuga contendo PBS, 1 mM PMSF (Sigma) e 1% BSA (Sigma) e incubados *overnight* a 4°C sob agitação. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 2000 g por

2 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C , para posterior determinação do título de IgA.

O ensaio de ELISA foi realizado para quantificar, nas fezes de camundongos imunizados, a presença de anticorpos IgA específicos para os antígenos de *R. equi* (APTX) (descrito no item 7).

Para tanto, placas de poliestireno de 96 poços (NUNC, Inc. Naperville USA) foram incubadas com a preparação antigênica APTX, na concentração final de $1\ \mu\text{g}$. A diluição foi feita em tampão carbonato de sódio $0,2\ \text{M}$, pH 9,6 ($100\ \mu\text{L}$ / poço). Após 24 horas de incubação a 4°C , as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T / Sigma) e incubadas com $200\ \mu\text{L}$ / poço de solução de bloqueio (PBS-T contendo gelatina a 3%) por 1 hora a 37°C . A seguir, as placas foram lavadas e incubadas com $100\ \mu\text{L}$ das amostras de material fecal por 2 horas a 37°C . Após 5 lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com anticorpos de coelho anti-IgA de camundongo biotilado (Sigma), diluído 1:500 em PBS-T-gelatina 1%, os quais foram detectados utilizando-se estreptoavidina-peroxidase (Sigma). Após 30 minutos de incubação a 37°C , os poços foram novamente lavados, sendo a reação antígeno-anticorpo revelada pela adição de $100\ \mu\text{L}$ / poço de tetrametilbenzidina (TMB / Pierce), na concentração sugerida pelo fabricante. A reação foi bloqueada pela adição de $50\ \mu\text{L}$ de ácido sulfúrico $2\ \text{M}$ (Merck) e a leitura realizada a $450\ \text{nm}$ em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC).

7) Obtenção da fração antigênica APTX

7.1- Cultivo e preparo da cepa virulenta de *R. equi*

Inicialmente, a massa bacteriana foi repicada em $250\ \text{mL}$ de caldo BHI (Oxoid) e a cultura mantida por 66 horas a 37°C sob agitação de $100\ \text{rpm}$. Foram realizadas leituras de absorvância a $600\ \text{nm}$, até atingir leitura igual a 1,3. Obtida a absorvância desejada, o material foi centrifugado a

2000 g por 20 minutos a 4°C e lavado uma vez com 100 mL de PBS. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado com 1 mL de PBS e, alíquotas de 50 mg foram estocadas a -20°C para posterior obtenção do antígeno de parede de *R. equi*.

7.2- Extração de antígenos da parede de *R. equi* virulento

A preparação de APTX, correspondente ao material extraído da parede celular de *R. equi*, tem como componente predominante a proteína associada à virulência, denominada VapA.

APTX foi obtido através da incubação das alíquotas de 50 mg do sedimento bacteriano (descritas no item anterior) com Triton X-114 (Sigma Chemical Co, St Louis, USA) a 2% em PBS e 1 mM de PMSF (Sigma), sob agitação por 12 horas a 4°C. Após incubação, o material foi centrifugado a 12000 g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante recuperado e incubado com sacarose 6% (Merck) por 10 minutos a 37°C (procedimento repetido duas vezes). A seguir, o material foi centrifugado e o sedimento incubado *overnight* a -20°C com acetona (Merck). O precipitado, recuperado por centrifugação, foi estocado a -20°C, para posterior utilização na dosagem de anticorpos e como estímulo *in vitro* (Tan *et al.*, 1995).

8) Atividade de APTX na ativação de macrófagos provenientes de camundongos vacinados

8.1- Obtenção de macrófagos murinos e estimulação *in vitro*

No 14º dia após a segunda imunização, grupos de 4 camundongos, imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA, inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS, foram sacrificados e as células coletadas por laparotomia da cavidade peritoneal com 5 mL de PBS estéril. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 250 g por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes desprezados e os precipitados celulares foram destituídos de

hemácias pela adição de 5 mL de tampão de lise (constituído de 9 partes de cloreto de amônio 0,16 M e 1 parte de Tris-HCl 0,17 M), durante 10 minutos em gelo. As células foram centrifugadas e, a seguir, foram lavadas 2 vezes em meio RPMI incompleto (Sigma, St. Louis-MO, USA). Os sedimentos celulares, obtidos por centrifugação, foram ressuspensos em 5 mL de meio RPMI completo [soro bovino fetal a 5% (Hyclone), aminoácidos não-essenciais (1:100) (Sigma), L-glutamina 0,04 M (Sigma) e gentamicina (50 µg / mL) (Gibco)]. Posteriormente, o número de células viáveis foi contado em câmara de Neubauer, utilizando-se a diluição 1:100 em solução de azul de Tripán 0,2% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ). A concentração foi ajustada para 2×10^6 células / mL e adicionou-se 800 µL por poço em placas de 24 poços (Corning, NY, USA). Após 2 horas de incubação em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂, as células aderentes foram cultivadas na presença de diferentes estímulos: IFN-γ (1 ng / mL) (BD Pharmingen), LPS (1 µg / mL) (*E. coli* – Sigma), APTX (5 µg / mL – obtido conforme descrito no item 7), APTX+IFN-γ ou somente meio de cultura completo. Após 24, 48 e 72 horas em condições de cultivo, os sobrenadantes foram coletados para posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico.

9) Obtenção, plaqueamento e estimulação de células esplênicas *in vitro*

Visando obter células esplênicas, grupos de 4 camundongos (imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137*vapA*, inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS) foram sacrificados 14 dias após a segunda imunização, removendo-se imediatamente seus baços assepticamente. Células esplênicas, obtidas por debridamento do órgão em PBS, foram centrifugadas a 4°C, 250 g por 10 minutos, os sobrenadantes desprezados e os precipitados celulares foram destituídos de hemácias pela adição de 5 mL de tampão de lise por baço, durante 10 minutos em gelo. Após nova centrifugação, as células foram lavadas 2 vezes com meio RPMI 1640

incompleto (Sigma, St. Louis-MO, USA) e ressuspensas em 2 mL de meio RPMI completo [soro bovino fetal a 5% (Hyclone), aminoácidos não-essenciais (1:100) (Sigma), L-glutamina 0,04 M (Sigma) e gentamicina (50 µg / mL) (Gibco)]. Em seguida, foi feita a contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se diluição de 1:100 em solução de azul de Tripan 0,2% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ). A concentração da suspensão celular foi acertada para 1×10^7 células / mL de RPMI completo. Um volume de 800 µL dessas células foi distribuído por poço (em duplicata) em placas de 24 poços (Corning, NY, USA) e cultivado na presença de diferentes estímulos: LPS+IFN- γ (1 µg / mL e 1 ng / mL, respectivamente), APTX (5 µg / mL) ou somente meio de cultura completo. As placas foram incubadas a 37°C, em estufa umidificada contendo 5% de CO₂. Os sobrenadantes foram coletados após 24, 48 e 72 horas para posterior dosagem de citocinas.

10) Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o sistema OptEIA™ SET: Mouse (Pharmingen, San Diego, CA, USA). As concentrações de cada citocina nos sobrenadantes foram calculadas utilizando-se a curva de regressão linear, a partir da curva padrão realizada para as respectivas citocinas.

10.1- Dosagem de IL-12 (p40 / p70) e IL-1 β

Placas para ELISA de alta afinidade (Corning Costar Europe Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 100 µL / poço de anticorpo monoclonal anti-IL-12p40, anti-IL-12p70 ou anti-IL-1 β , diluídos 1:250 em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, conforme instrução do fabricante, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com solução tamponada com fosfato 0,6 M, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween

20 (PBS-T) e incubadas com uma solução de PBS acrescido com 10% de soro fetal bovino inativado (solução de bloqueio – PBS-BSA) (Sigma) durante 1 hora à temperatura ambiente. Aos poços das placas foram adicionados, em duplicata, as citocinas recombinantes (curva-padrão iniciada na concentração de 1000 pg / mL) e as amostras, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e foram adicionados os anticorpos secundários biotinizados (anticorpo de detecção) específicos para cada citocina, diluídos 1:250, que haviam sido pré-incubado por 15 minutos com avidina conjugada a peroxidase. As placas foram, então, incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora. Após nova etapa de lavagem foi adicionado o revelador tetrametilbenzidina (TMB / Pierce). As reações foram bloqueadas, após 20 minutos, com ácido sulfúrico 2 M e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC).

10.2- Dosagem de TNF- α

Para a dosagem de TNF- α foi adotado protocolo semelhante ao utilizado para a dosagem de IL-12, com exceção da etapa referente ao anticorpo de detecção. O anticorpo anti-TNF- α biotinizado, diluído 1:500 em PBS-BSA, foi adicionado à placa e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagens, adicionou-se avidina conjugada a peroxidase (1:250) por mais 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Seguiu-se então novo ciclo de lavagem e a reatividade foi determinada como descrito no item 10.1.

10.3- Dosagem de IFN- γ

Para a dosagem de IFN- γ , placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar Europe Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 100 μ L / poço de anticorpo de captura

anti-IFN- γ , diluído 1:2000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9.6, por 24 horas a 4°C. Após lavagens e bloqueio como descritos no item 10.1, as placas foram incubadas com as amostras dos animais pertencentes aos três grupos e com diferentes concentrações de IFN- γ murino recombinante (curva-padrão iniciada na concentração de 2000 pg / mL), seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e adicionou-se o anticorpo anti-IFN- γ biotinilado (anticorpo de detecção), diluído 1:250, que havia sido pré-incubado por 15 minutos com avidina conjugada à peroxidase (1:250). Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, seguiu-se novo ciclo de lavagem e a reatividade foi determinada como descrito no item 10.1.

10.4- Dosagem de IL-10

A dosagem de IL-10 foi realizada utilizando-se o mesmo protocolo descrito no item 10.1, com exceção da etapa referente à concentração inicial da citocina recombinante. Neste caso, a curva-padrão é iniciada na concentração de 2000 pg / mL e não em 1000 pg / mL como utilizado para IL-12 e IL-1 β .

10.5- Dosagem de IL-4

A dosagem de IL-4 foi realizada utilizando-se o mesmo protocolo descrito no item 10.1, com exceção da etapa referente à concentração inicial da citocina recombinante. Neste caso, a curva-padrão é iniciada na concentração de 500 pg / mL e não em 1000 pg / mL como utilizado para IL-12 e IL-1 β .

11) Dosagem de óxido nítrico (NO)

A concentração de NO₂ no sobrenadante de células aderentes e no homogeneizado dos órgãos foi determinada utilizando-se o método de Griess (Green *et al.*, 1982). Em placas de 96 poços (Corning), 50 µL do sobrenadante foram incubados com igual volume do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride 0,1% e ácido fosfórico 2,5%) por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a absorvância em 540 nm foi determinada em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC). Os resultados foram expressos em µM de NO₂ comparados com a curva padrão realizada com nitrito de sódio em concentrações de 200 a 0,78 µM.

12) Infecção de camundongos com *R. equi* virulento

12.1- Cultivo, preparo e obtenção de suspensões de *R. equi*

Inicialmente foi feito um inóculo de *R. equi* em 250 mL de caldo BHI (*brain heart infusion*). A seguir, a cultura foi mantida por 66 horas a 37°C sob agitação a 100 rpm. Foram realizadas leituras de absorvância a 600 nm, até atingir leitura igual a 1,3. Obtida a absorvância desejada, o material foi centrifugado a 2000 g, 4°C e lavado com PBS. O sedimento foi ressuscitado em 1 mL de PBS e a suspensão de *R. equi* diluída seriadamente (10⁻¹ a 10⁻⁹). Posteriormente, 100 µL das diluições entre 10⁻⁷ a 10⁻⁹ foram semeadas em placas de petri (ágar BHI). Após 48 horas de incubação a 37°C, foi feita a contagem das colônias que cresceram no ágar, como forma de estimar o número de bactérias na amostra original a ser inoculada em camundongos.

12.2- Inoculação em camundongos

Parte do material original, presente no tubo que continha a diluição 10^{-3} (descrito acima), foi utilizado para inoculação em camundongos dos grupos I (*S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA), II (*S. enterica* Typhimurium pYA3137) e III (PBS). Sendo assim, os animais foram desafiados com aproximadamente 4×10^6 UFC de *R. equi* virulento, por via endovenosa, 14 dias após a última imunização.

13) Dosagem de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio nos órgãos de camundongos desafiados

Para a realização desse ensaio, grupos de 4 animais foram sacrificados nos dias 2, 4, 8 e 10 após o desafio. Os órgãos (pulmão, baço e fígado) foram coletados, pesados e divulsionados em homogeneizador elétrico (04728-00/OMNI Mixer Homogeneizer Systems) contendo 1 mL de PBS estéril e inibidor enzimático (protease inhibitor, Boehringer Mannheim, Germany). O homogeneizado obtido foi centrifugado a 250 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante colhido e estocado a -20°C para posterior dosagem de citocinas (descrito no item 10), NO (descrito no item 11) e H_2O_2 (descrito no item 14).

14) Dosagem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A produção de H_2O_2 foi quantificada pelo método baseado na oxidação do vermelho de fenol pela H_2O_2 , dependente de peroxidase, segundo Pick & Mizel (1981). Em placas de cultura de 96 poços, foram aplicados 10 μ L dos sobrenadantes dos órgãos de cada animal. A seguir, 100 μ L de solução vermelho de fenol [SVF – constituída de PBS acrescido de vermelho de fenol a 0,56 mM (Sigma), peroxidase a 0,01mg / mL (Sigma) e dextrose a 5,5 mM (Sigma)] foram adicionados a

cada poço. A curva-padrão foi obtida utilizando concentrações molares de H₂O₂ previamente conhecidas: 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 nmoles / 100 µL de SVF. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. A reação foi bloqueada pela adição de 10 µL de NaOH 1 M (Reagen) a cada poço. A leitura foi realizada a 620 nm em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC). Os resultados obtidos foram expressos em nmoles de H₂O₂ liberados por grama de tecido, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão.

15) Quantificação da expressão de RNAm de fatores de transcrição por PCR em Tempo Real

O baço dos animais, desafiados ou não com *R. equi* virulento, foi utilizado para a quantificação da expressão de fatores de transcrição. Para a realização da análise dos animais somente imunizados, os baços dos camundongos foram coletados 14 dias após a segunda inoculação com: *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA, *S. enterica* Typhimurium pYA3137 ou PBS. Para a realização da análise dos animais desafiados, o baço dos camundongos pertencentes aos três grupos foram coletados 8 dias após o desafio.

15.1- Extração de RNA

A extração de RNA total dos baços foi feita com Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), segundo o protocolo do fabricante. Brevemente, as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de Trizol e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, o RNA total foi extraído adicionando-se 200 µL de clorofórmio (Merk, Darmstadt, Germany). Após incubação de 3 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo. O RNA foi precipitado com 500 µL de álcool isopropílico (Sigma) e, decorridos 10 minutos de incubação, as amostras foram

novamente centrifugadas. O precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% (Merck) e, posteriormente, ressuspensão em água livre de DNase e RNase (Gibco, Grand Island, NY, USA).

15.2- Transcrição reversa (RT)

O RNA total foi convertido em cDNA por transcrição reversa, sendo cada reação preparada em um volume final de 20 µL. Inicialmente, 2 µg de RNA e 20 pmol de Oligo dT (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) foram incubados a 70°C por 5 minutos e, em seguida, mantidos em gelo por mais 5 minutos. Decorrido esse tempo, foi adicionada às amostras uma mistura contendo 0,5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (100 mM dNTP Set, PCR Grade, Invitrogen), 20 unidades de inibidor de RNase (RNaseOut Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen), 1 µL de transcriptase reversa (ImProm-II Reverse Transcriptase, Promega Corporation, Madison, WI, USA), 3 mM de MgCl₂ e 4 µL de tampão da reação. A reação de RT foi feita segundo instruções do fabricante. A mistura foi incubada por 5 minutos a 25°C, seguida de 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C. As amostras foram então tratadas com 10 µg de RNase (Gibco, Grand Island, NY, USA), por 30 minutos a 37°C.

15.3- PCR em Tempo Real

As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em volume final de 20 µL, contendo 2 µL de cDNA, 0,5 µL de cada *primer* e 10 µL de SYBR Green™ PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foi utilizado o Sistema de PCR em Tempo Real da Applied Biosystems 7300 para detectar e quantificar a amplificação do DNA com SYBR Green™. Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 50°C por 2 minutos, seguida de 10 minutos a 95°C, para ativação da enzima

AmpliTaq Gold. Seguiram-se 40 ciclos de incubação a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Todas as quantificações foram normalizadas em relação ao controle endógeno (β -actina).

15.4- Primers utilizados na PCR em Tempo Real

As sequências de RNA mensageiro para os fatores de transcrição foram retiradas do banco de dados do *website* NCBI. Todos os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express (v2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os *primers* (Erviergas, São Paulo, SP, Brasil) são constituídos de 20 pares de bases, possuindo temperatura de *melting* igual a 58°C e capacidade de amplificar fragmentos de cerca de 100 pares de bases. A tabela a seguir resume as sequências dos *primers* específicos:

Sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados para análise de PCR em Tempo Real

Gene	Sequência (5' – 3')
<i>Primer*</i>	
β -actina	
S	CCTAAGGCCAACCGTGAAAA
AS	GAGGCATACAGGGACAGCACA
GATA-3	
S	AAGAAAGGCATGAAGGACGC
AS	GTGTGCCCATTTGGACATCA
T-bet	
S	CACTAAGCAAGGACGGCGAA
AS	CCACCAAGACCACATCCACA
Foxp3	
S	CCGGCCTATTTTACACCAACC
AS	ATTCGAAAAATGGGTGCAGAA
TGF- β	
S	GACTCTCCACCTGCAAGACCA
AS	GGGACTGGCGAGCCTTAGTT

*S, *primer sense*; AS, *primer anti-sense*

16) Ensaio de proliferação celular frente ao antígeno APTX de *R. equi*

Os animais utilizados, imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA, inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS, desafiados ou não com *R. equi*, foram sacrificados por deslocamento cervical. O baço de cada animal foi retirado e colocado em placas de Petri; em cada órgão foram injetados 5 mL de PBS para obtenção de células esplênicas totais. A preparação resultante foi incubada por 10 minutos a 4°C com 2 mL de tampão de lise (cloreto de amônio 0,16 M e Tris 0,17 M, pH7,6) e centrifugada a 250 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o precipitado foi lavado duas vezes com meio RPMI 1640 incompleto, o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas para uma concentração de 1×10^7 células / mL em meio RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino. A suspensão celular foi distribuída, num volume de 180 μ L / poço, em placas de 96 poços (1×10^7 célula / poço) e cultivada com 20 μ L de APTX (5 μ g / mL), Con-A (2 μ g / mL) (Sigma) ou somente meio de cultura por 72 horas a 37°C na presença de 5% de CO₂. Foi adicionado metil-3H-timidina (Amersham Pharmacia biotech do Brasil, LTDA), 18 horas antes do término da cultura, numa concentração de 0,5 μ Ci por poço. Após o período de incubação, a quantidade de timidina incorporada pelas células foi determinada utilizando-se um coletor automático de células (Cell Harvest, Cambridge Technology Inc., MA) e o nível de incorporação, refletindo a proliferação celular ocorrida, foi determinado em contador de cintilação líquida (LS-6500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). A média para contagem por minuto (cpm \pm SD) foi avaliada em triplicata.

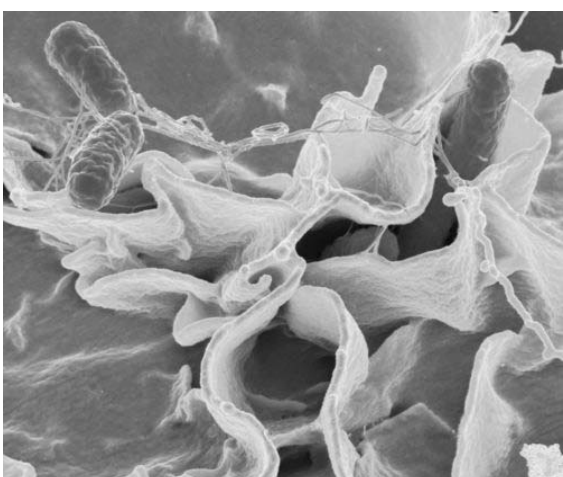
17) Análise das populações celulares presentes no baço de animais imunizados, desafiados ou não com *R. equi*

Células provenientes do baço de camundongos imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA, inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS, desafiados ou não com *R. equi*, foram submetidas a análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo. Brevemente, as células esplênicas de cada animal (n=4 / grupo) foram ressuspensas de maneira a se obter uma concentração final de 1×10^7 células / mL. A 100 μ L dessa suspensão celular, contida em tubo especial para análise por citometria, foi adicionado 100 μ L do anticorpo anti-CD16 / CD32 (Fc blockTM), clone 2.4G2, a fim de evitar ligações inespecíficas. Após incubação de 30 minutos a 4°C, as células foram incubadas por mais 40 minutos com anticorpos anti-CD19, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD25, marcados com ficoeritrina-PE ou com isocianato de fluoresceína-FITC (Caltag / Invitrogen, Carlsbad, CA,USA), diluídos em PBS / BSA (Sigma). Finalmente, as células foram lavadas, fixadas em PBS contendo 1% de formol a 37% e analisadas por citometria de fluxo em FacSort (Becton Dickson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa Cell Quest (Becton Dickson) e Win MDI (versão 2.8).

18) Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os valores foram comparados usando o teste de Tukey após análise de variância com nível de significância de $p < 0,001$: extremamente significante, $p < 0,01$: muito significante e $p < 0,05$: significante. A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS, versão 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

R E S U L T A D O S



RESULTADOS

PARTE I: ENSAIOS REALIZADOS COM ANIMAIS VACINADOS E CONTROLES

1) Avaliação da resposta imune humoral: dosagem de IgG total, IgG1 e IgG2a séricas

Com o intuito de averiguar se o processo de imunização com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA gera resposta imunitária humoral satisfatória, os soros dos camundongos vacinados e de camundongos controles, inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS, foram ensaiados por ELISA para detecção de anticorpos específicos. Uma forte resposta de IgG antígeno-específico foi encontrada no soro dos animais imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 expressando VapA, duas semanas após a última imunização. Soros diluídos até o título de 1:240 proporcionaram absorbâncias correspondentes à pelo menos o triplo dos valores determinados pelos soros de animais dos outros dois grupos (**Figura 1**).

Para avaliar se o perfil de resposta imune desenvolvido pelo processo de imunização seria do tipo Th1 ou Th2, foi verificada a produção de imunoglobulinas G específicas para os antígenos de *R. equi*, das subclasses IgG1 e IgG2a. Os resultados demonstram que a imunização com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA induziu a produção tanto de IgG1 (isotipo próprio de respostas de padrão Th2) quanto de IgG2a (isotipo próprio de padrão Th1); contudo, os níveis de IgG2a detectados no soro dos animais vacinados foram consistentemente superiores aos de IgG1 (**Figura 2**). A produção de IgG2a foi pelo menos 2 vezes maior do que a produção de IgG1 em todos os dias analisados (**Figura 2**). Assim, os resultados indicam que a imunização com a linhagem recombinante de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 expressando VapA tenha induzido resposta imunitária predominantemente de padrão Th1.

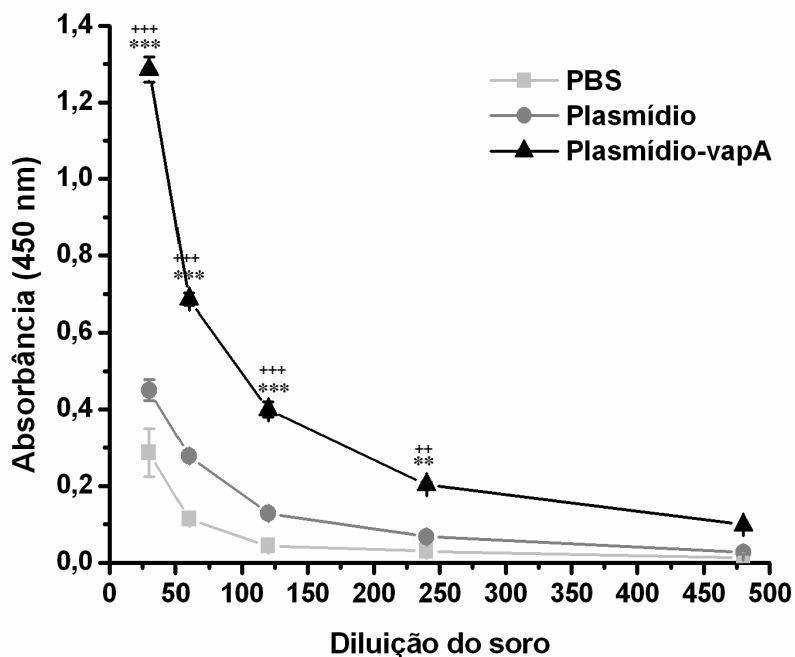


Figura 1: Detecção de anticorpos séricos antígeno-específicos em camundongos imunizados com *S. enterica* expressando a proteína VapA de *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μ L de PBS (PBS) ou com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a última imunização, o sangue dos animais foi coletado e os soros (em diferentes diluições – 1:30, 1:60, 1:120, 1:240 e 1:480) foram ensaiados por ELISA, utilizando-se microplacas sensibilizadas com o antígeno total de parede de *R. equi* (APTX – 1 μ g / mL). Cada ponto do gráfico representa a média \pm SD do soro obtido de 4 animais, isoladamente, feito em duplicata, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significativa e ** $p < 0,01$ muito significativa em relação a IgG total antígeno-específico detectada no grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137; +++ $p < 0,001$ extremamente significativa e ++ $p < 0,01$ muito significativa em relação a IgG total antígeno-específico detectada no grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).

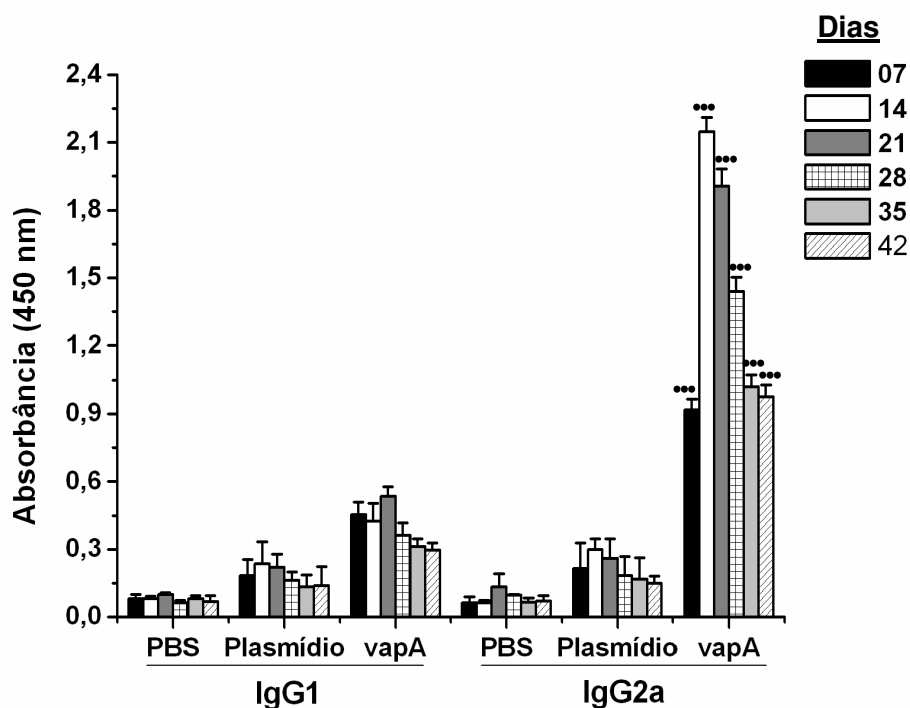


Figura 2: Isotipagem dos anticorpos séricos (IgG1 e IgG2a) antígeno-específicos em camundongos imunizados com *S. enterica* expressando a proteína VapA. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral, nos dias 0 e 14, com 200 μ L de PBS (PBS) ou com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo). Nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a segunda imunização, o sangue dos animais foi coletado e os soros (diluição 1:30) foram ensaiados por ELISA, utilizando-se microplacas sensibilizadas com o antígeno total de parede de *R. equi* (APTX – 1 μ g / mL). As barras representam a média \pm SD do soro obtido de 4 animais, isoladamente, feito em duplicata, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significativa em relação a detecção de IgG1 no mesmo grupo de animais, durante o mesmo período de tempo (teste de Tukey).

2) Avaliação da resposta imune de mucosa: dosagem de IgA no material fecal

Devido ao fato de linhagens vacinais de *Salmonella* serem capazes de induzir efetiva imunidade de mucosa, foi avaliada a produção de IgA pelos animais imunizados por via oral. Para tanto, as fezes de camundongos foram coletadas em diferentes dias após a segunda imunização e analisadas por ELISA. Uma intensa resposta de anticorpos IgA antígeno-específicos foi detectada em animais imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 expressando VapA. Sete dias após a segunda imunização, o título de IgA correspondia a pelo menos o quántuplo dos valores detectados nas fezes de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 carregando somente o plasmídeo, ou daqueles inoculados apenas com PBS (**Figura 3**). Em todos os dias analisados, os camundongos vacinados produziram níveis significativamente superiores de IgA antígeno-específicas em relação aos determinados nas fezes de animais dos outros dois grupos. As maiores concentrações de anticorpos nas fezes de animais vacinados foram detectadas nos 35° e 42° dias após a segunda imunização (**Figura 3**), indicando que o processo de vacinação induziu resposta de mucosa duradoura.

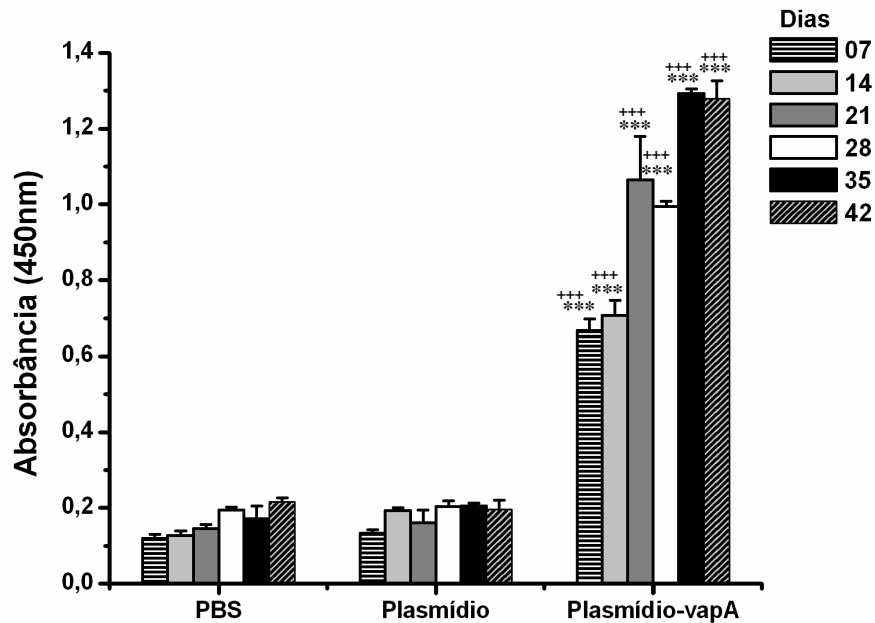


Figura 3: Detecção de anticorpos IgA específicos nas fezes de camundongos vacinados e controles.

Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μL de PBS (PBS) ou com 200 μL (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137 (Plasmídeo), nos dias 0 e 14. As fezes coletadas nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a última imunização foram ensaiadas por ELISA, utilizando-se microplacas sensibilizadas com o antígeno APTX de *R. equi* (1 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Anticorpos reativos foram revelados por imunoglobulina de coelho anti-IgA de camundongo. As barras representam a média \pm SD dos valores obtidos das fezes de 4 animais, isoladamente, feito em duplicata, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significante em relação a IgA antígeno-específico detectada no grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137 e +++ $p < 0,001$ extremamente significante em relação a IgA antígeno-específico detectada no grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).

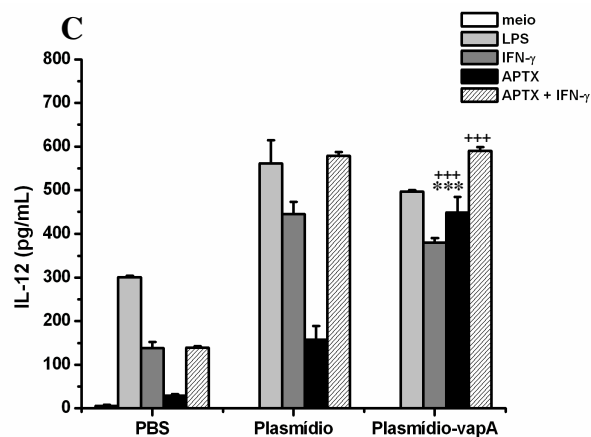
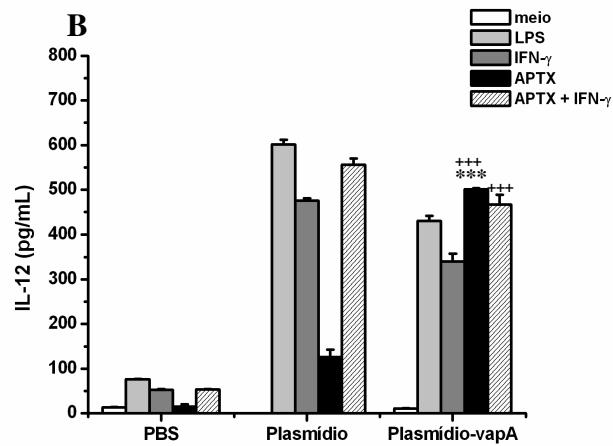
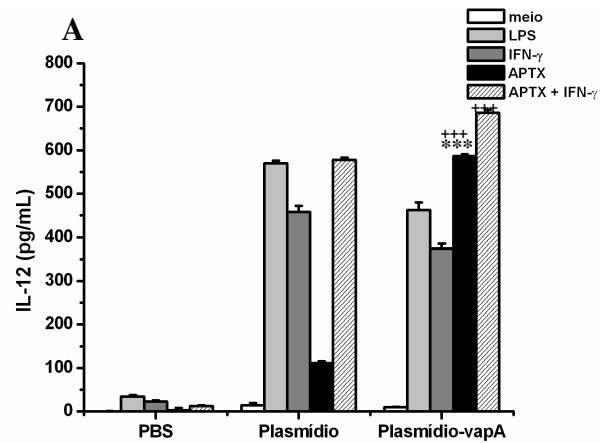
3) Produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos peritoneais

A fim de avaliar o estado de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos vacinados, foi verificada a produção de citocinas e de óxido nítrico *in vitro* por esse tipo celular. Inicialmente, animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA, com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS tiveram suas células peritoneais coletadas e cultivadas, na presença de diferentes estímulos, por 24, 48 e 72 horas. A seguir, os sobrenadantes das culturas foram coletados e utilizados para determinação da produção de citocinas e de NO.

Com relação à produção de IL-12, células peritoneais de camundongos vacinados (Plasmídio-vapA) secretaram essa citocina durante todo o período analisado. Dentre os estímulos ensaiados, a preparação de antígenos de parede de *R. equi* (APTX), associado ou não a IFN- γ , foi o mais efetivo em induzir a produção de IL-12 por macrófagos provenientes de animais vacinados, durante as primeiras 24 horas de cultura (**Figuras 4A e 4D**), visto que, nesse período, APTX induziu a secreção de concentrações de IL-12 que foram: a) 61 vezes superiores às proporcionadas pelas mesmas células na ausência de estímulos (meio); b) pelo menos 5 vezes superiores às proporcionadas por células dos animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e, c) cerca de 225 vezes superiores às proporcionadas por células dos animais que receberam apenas PBS. Ainda nas primeiras 24 horas de incubação, a associação de APTX com IFN- γ potencializou a produção de IL-12 pelos macrófagos peritoneais de animais vacinados (**Figuras 4A e 4D**).

Com o decorrer do tempo, a produção de IL-12 por células de animais vacinados estimuladas com APTX diminuiu; ainda assim, a produção foi mantida em níveis significativamente superiores aos produzidos por células de animais controles, também estimuladas com APTX (**Figuras 4B, 4C e 4D**). A associação de APTX com IFN- γ potencializou

a produção de IL-12 pelos macrófagos peritoneais de animais vacinados, após 72 horas de incubação (**Figuras 4C e 4D**).



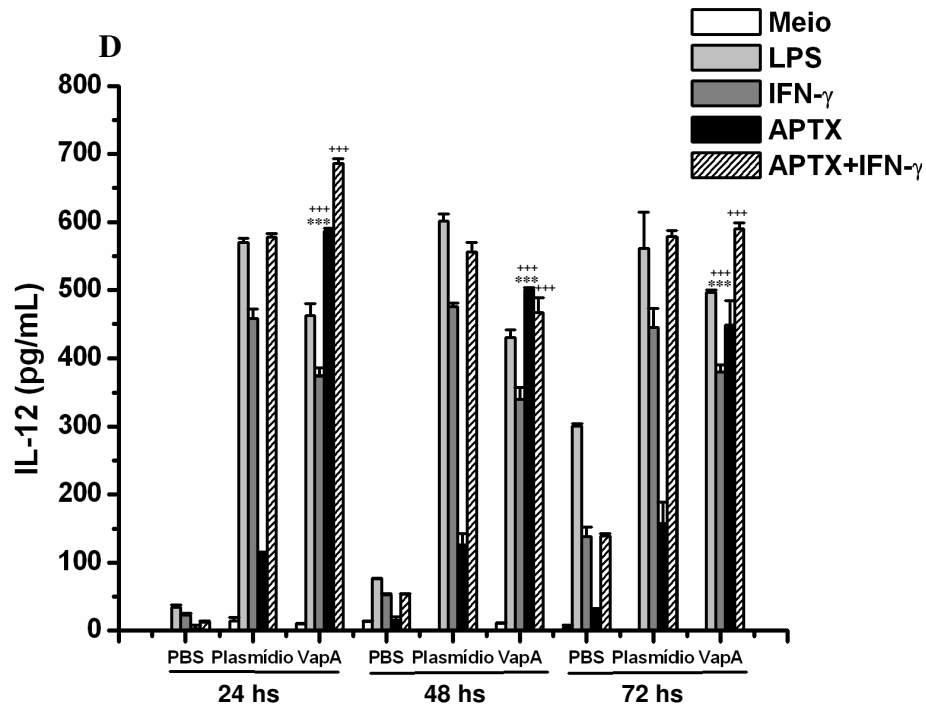
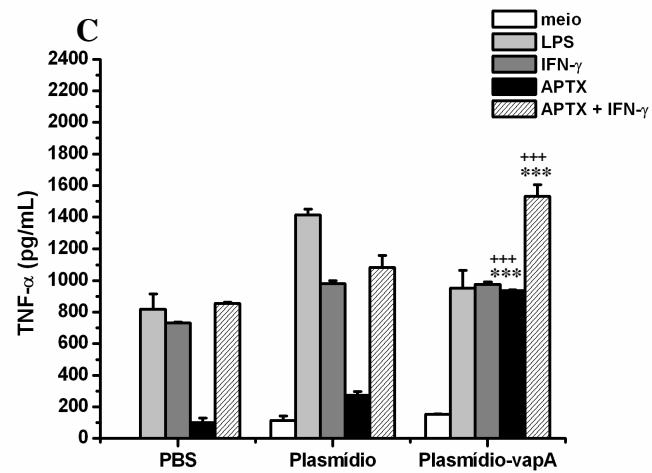
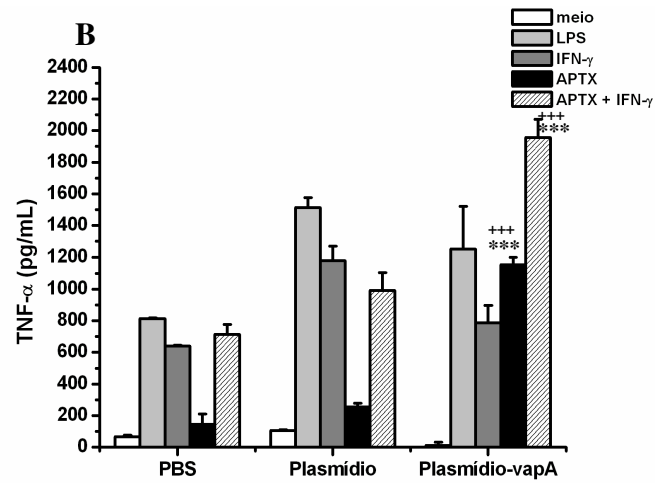
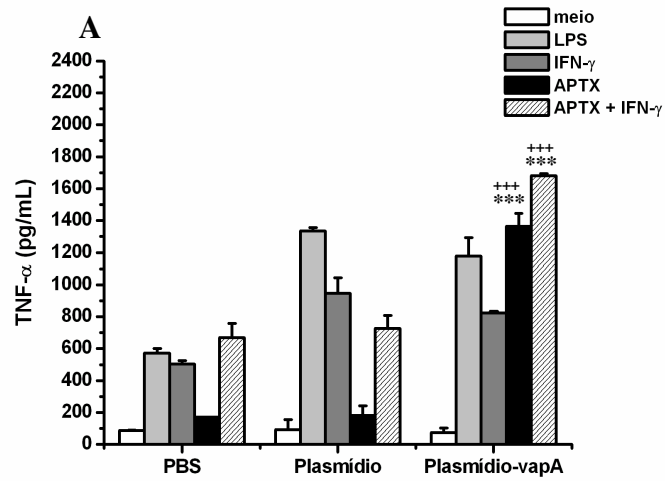


Figura 4: Produção de IL-12 (p40 / p70) por células peritoneais murinas. Camundongos BALB/c foram imunizados por via oral com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA / VapA), com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou apenas inoculados com PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, células residentes da cavidade peritoneal dos animais foram plaqueadas (2×10^6 células / poço) e incubadas por 24, 48 e 72 horas apenas com meio (controle negativo) ou com meio acrescido de diferentes estímulos: LPS (1 μ g / mL), IFN- γ (1 ng / mL), APTX (5 μ g / mL) e APTX+IFN- γ . Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas (A e D), 48 horas (B e D) e 72 horas (C e D) após incubação e a concentração de IL-12 foi determinada por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos, onde: ***p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e +++p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, frente ao mesmo estímulo, durante o mesmo período de tempo (teste de Tukey).

Células peritoneais de camundongos vacinados, sob estímulo com APTX, foram as que produziram maiores quantidades de TNF- α em todos os períodos analisados. Após 24 horas de cultura, as células peritoneais desses animais secretaram cerca de 7 vezes mais TNF- α do que células dos animais controles (**Figuras 5A e 5D**). Com 48 horas, a produção foi cerca de 5 vezes maior em relação a de células dos animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e se manteve 7 vezes maior em relação às células dos animais que receberam somente PBS (**Figuras 5B e 5D**). Após 72 horas, os níveis passaram a ser 3 vezes maiores do que os produzidos por células de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e cerca de 9 vezes maiores do que os de células de animais que receberam somente PBS (**Figuras 5C e 5D**). A associação de APTX com IFN- γ potencializou a produção de TNF- α , predominantemente com 48 horas de cultivo (**Figura 5**).



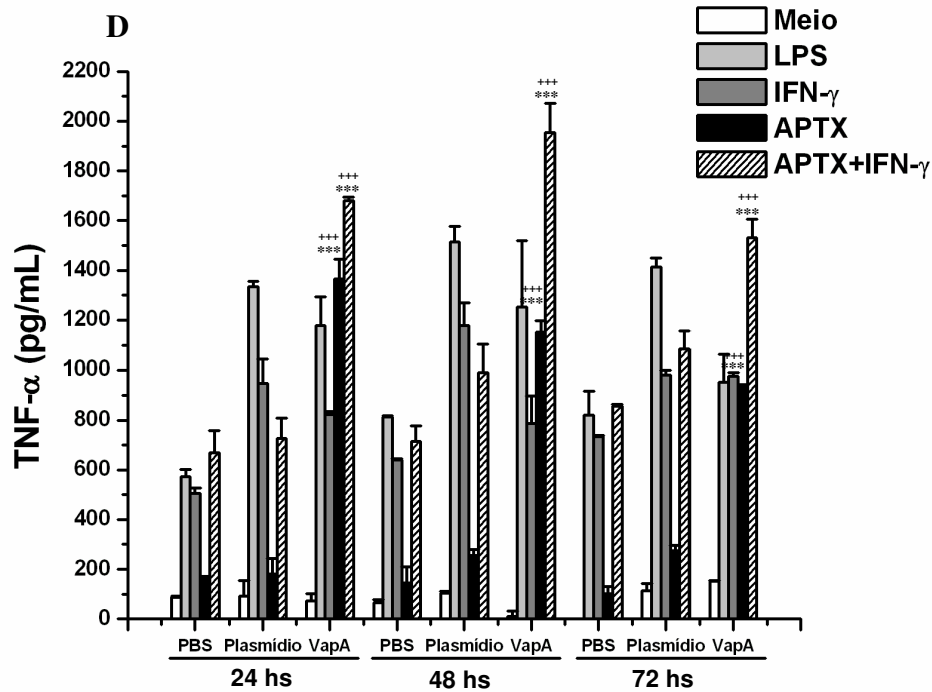


Figura 5: Produção de TNF- α por células peritoneais murinas. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA / VapA), com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou apenas com PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, células residentes da cavidade peritoneal dos animais foram plaqueadas (2×10^6 células / poço) e incubadas por 24, 48 e 72 horas apenas com meio (controle negativo) ou com meio acrescido de diferentes estímulos: LPS (1 μ g / mL), IFN- γ (1 ng / mL), APTX (5 μ g / mL) e APTX+IFN- γ . Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas (A e D), 48 horas (B e D) e 72 horas (C e D) após incubação e a concentração de TNF- α determinada por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos, onde: ***p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e +++p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, frente ao mesmo estímulo, durante o mesmo período de tempo (teste de Tukey).

Os níveis de IL-1 β secretados por células peritoneais de camundongos vacinados, quando estimuladas com APTX, foram significativamente maiores do que os produzidos pelos outros dois grupos de animais, após 72 horas de incubação (**Figura 6**). Macrófagos peritoneais desses animais produziram níveis de IL-1 β correspondentes ao dobro dos produzidos por células dos animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e ao quádruplo dos produzidos por células dos animais que receberam apenas PBS (**Figura 6**). Não houve detecção de IL-1 β nos sobrenadantes das culturas após 24 e 48 horas de incubação com os diferentes estímulos (dados não mostrados).

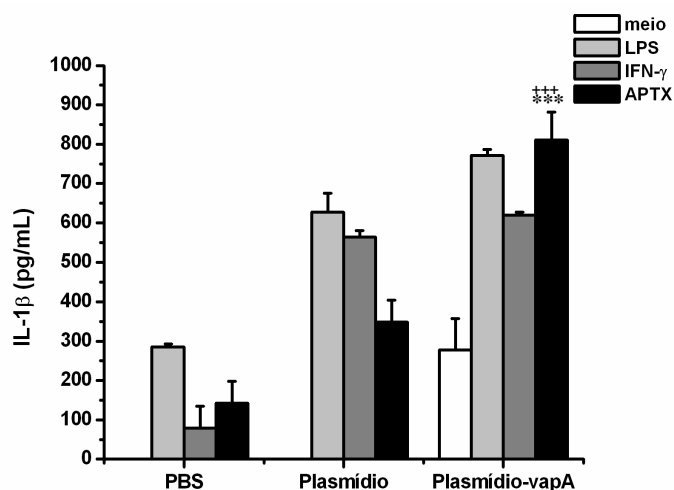
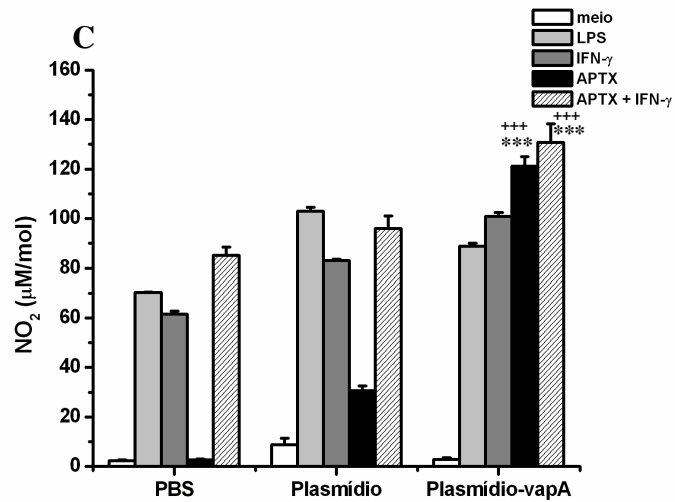
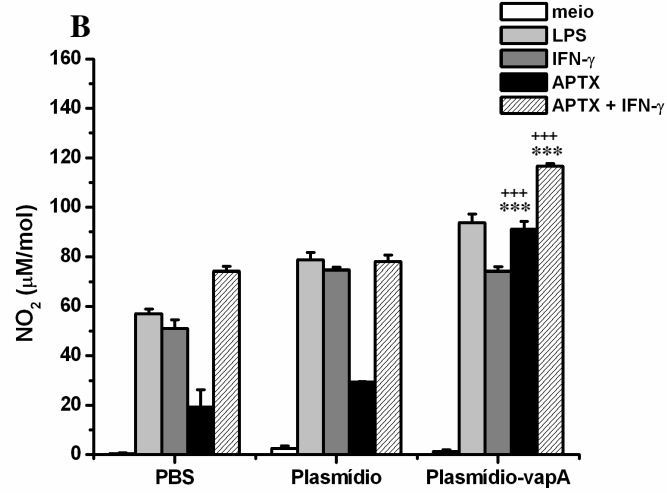
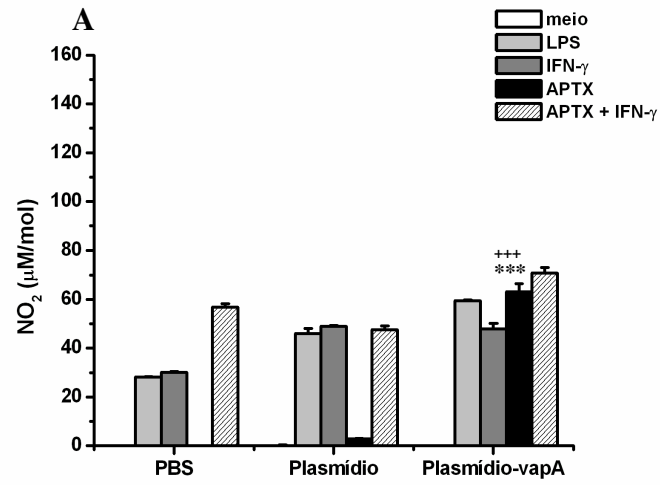


Figura 6: Produção de IL-1 β por células peritoneais murinas. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA), com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, células residentes da cavidade peritoneal dos animais foram plaqueadas (2×10^6 células / poço) e incubadas por 72 horas apenas com meio (controle negativo) ou com meio acrescido de diferentes estímulos: LPS (1 μ g / mL), IFN- γ (1 ng / mL) e APTX (5 μ g / mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados e a concentração de IL-1 β foi determinada por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos, onde: ***p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e +++p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, frente ao mesmo estímulo (teste de Tukey).

Assim como para as citocinas, as maiores produções de óxido nítrico em resposta ao estímulo com APTX, foram obtidas de células peritoneais dos camundongos vacinados. Concentrações crescentes de NO foram produzidas no decorrer do tempo: 63,14 μM / mol nas primeiras 24 horas de incubação; 91,1 μM / mol com 48 horas e 121,2 μM / mol com 72 horas (**Figura 7**). Essas concentrações foram significativamente superiores em relação às verificadas em células dos animais pertencentes aos outros dois grupos, durante o mesmo período de incubação (**Figura 7**). A associação de APTX com IFN- γ potencializou a produção de NO por macrófagos provenientes de camundongos vacinados, predominantemente com 48 horas de cultivo (**Figura 7B e 7D**). Assim, podemos concluir que a imunização com *Salmonella* expressando VapA induz a produção de NO em níveis significativamente superiores aos verificados nos dois grupos controles.



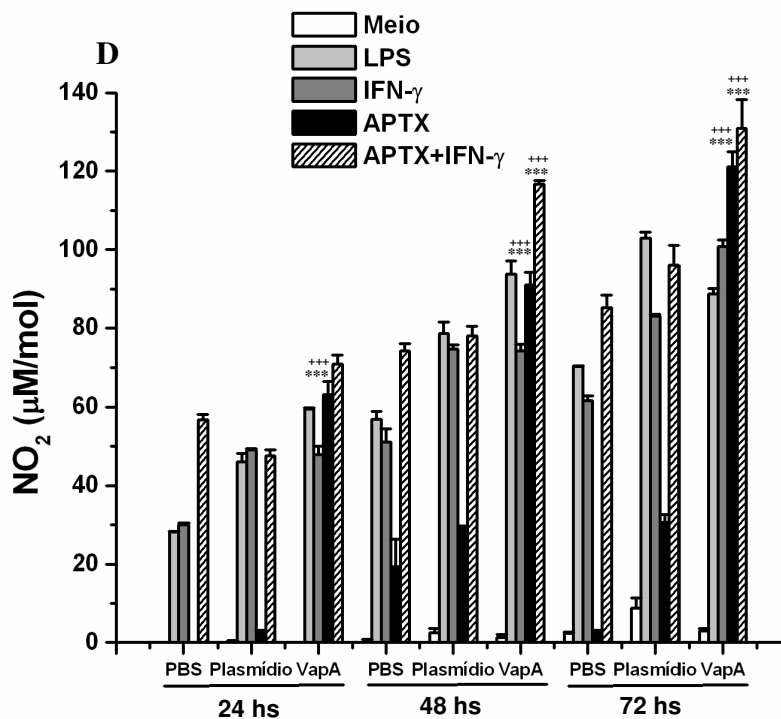


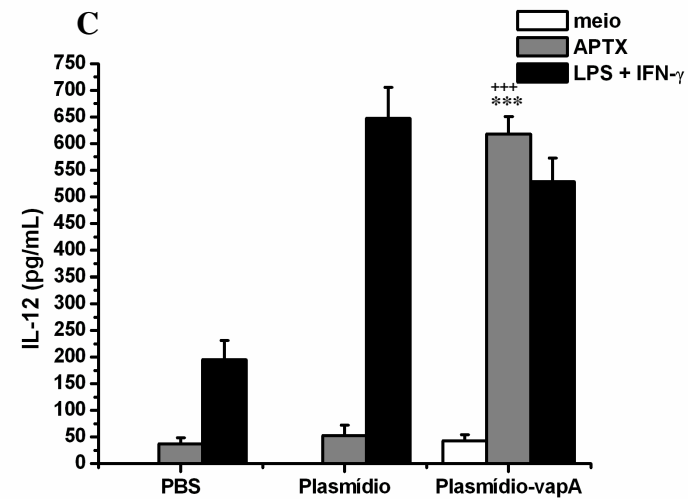
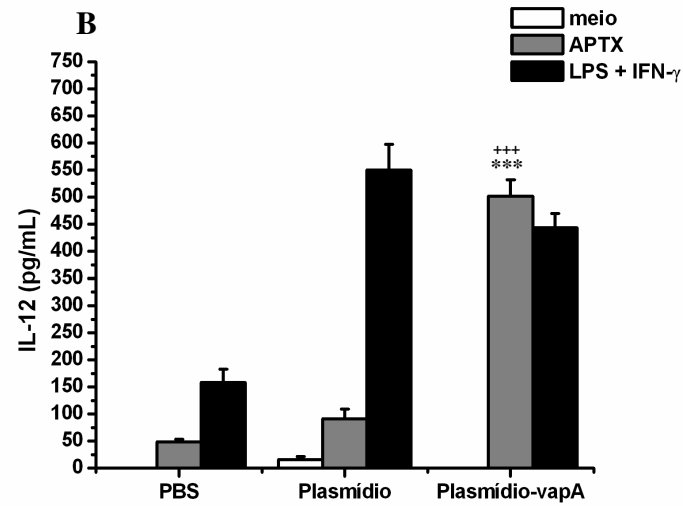
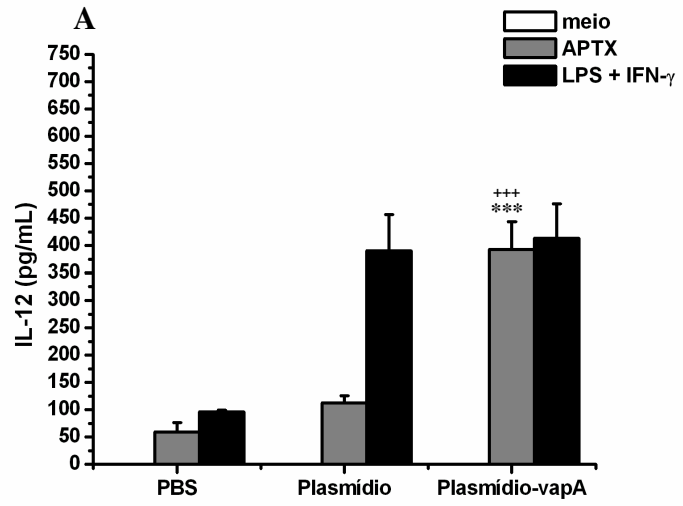
Figura 7: Produção de óxido nítrico por células peritoneais murinas. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA / VapA), com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou apenas com PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, células residentes da cavidade peritoneal dos animais foram plaqueadas (2×10^6 células / poço) e incubadas apenas com meio (controle negativo) ou com meio acrescido de diferentes estímulos: LPS (1 μ g / mL), IFN- γ (1 ng / mL), APTX (5 μ g / mL) e APTX+IFN- γ . Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas (A e D), 48 horas (B e D) e 72 horas (C e D) após incubação. A concentração de nitrito foi estimada através do método de Griess. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos, onde: ***p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e +++p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, frente ao mesmo estímulo, durante o mesmo período de tempo (teste de Tukey).

4) Produção de citocinas por células esplênicas

Com o objetivo de confirmar se o processo de imunização de camundongos BALB/c com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 expressando VapA levaria ao desenvolvimento de uma resposta predominantemente Th1, foi realizada dosagem de citocinas produzidas por células esplênicas desses animais, após estimulação *in vitro*. Para tanto, células do baço de camundongos vacinados e de controles foram coletadas e cultivadas, sob efeito de diferentes estímulos. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, os sobrenadantes das culturas foram recuperados e ensaiados por ELISA, quanto à produção de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10.

As concentrações das citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α nos sobrenadantes das células dos animais vacinados, estimuladas com APTX, foram muito superiores às proporcionadas por células dos mesmos animais não-estimuladas (incubadas somente com meio) ou por células de animais dos outros dois grupos, também estimuladas com APTX (**Figuras 8, 9 e 10**).

No que tange à produção de IL-12 por células esplênicas de animais vacinados, frente ao estímulo com APTX, os níveis detectados foram cerca de 3, 5 e 11 vezes maiores do que os produzidos por células de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e, cerca de 6, 10 e 16 vezes maiores do que os produzidos por células de animais inoculados com PBS, durante 24, 48 e 72 horas de incubação, respectivamente (**Figura 8**). Essas mesmas células de animais vacinados, na ausência de estímulo, proporcionaram resultados semelhantes aos de células de animais controles (**Figura 8**).



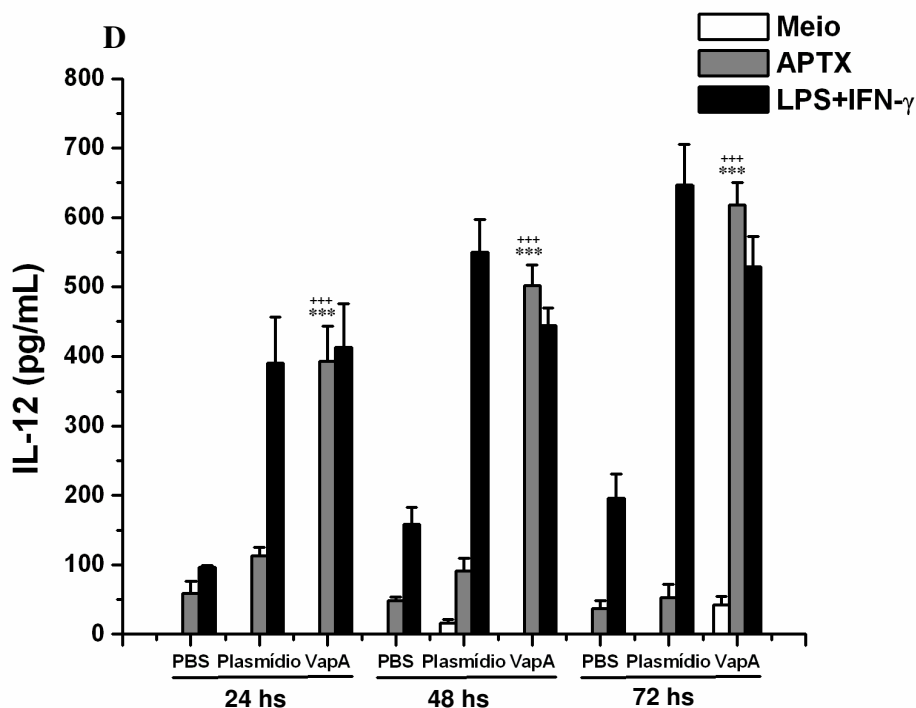
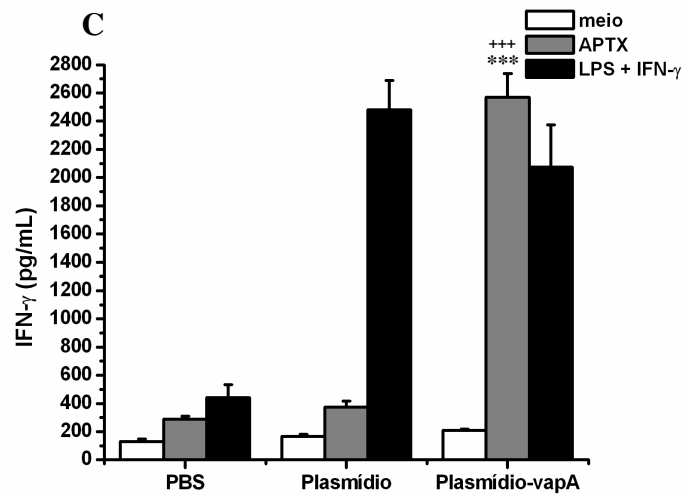
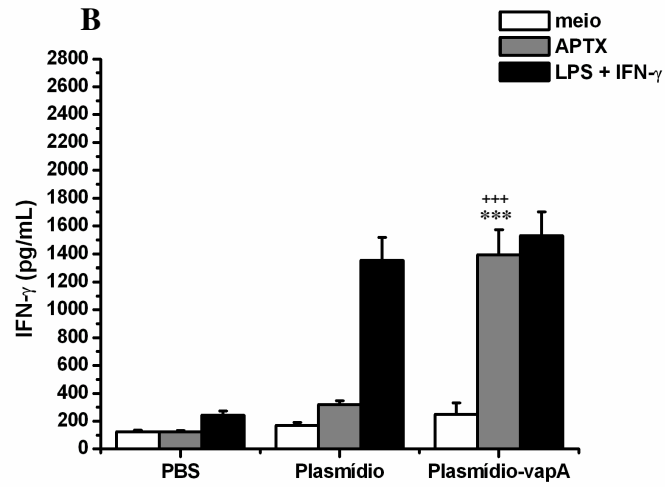
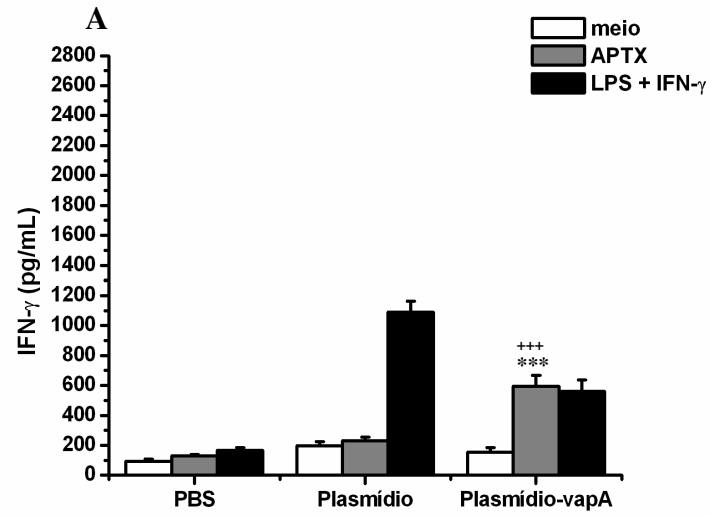


Figura 8: Produção de IL-12 (p40 / p70) por células esplênicas. Camundongos BALB/c foram inoculados, por via oral, com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA / VapA), com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, células esplênicas dos animais foram plaqueadas (1×10^7 células / poço) e incubadas apenas com meio ou com meio acrescido dos seguintes estímulos: LPS ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) + IFN- γ ($1 \text{ ng} / \text{mL}$) ou APTX ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas (A e D), 48 horas (B e D) e 72 horas (C e D) após incubação e a concentração de IL-12 foi determinada por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e $^{+++}p < 0,001$ extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, frente ao mesmo estímulo, durante o mesmo período de tempo (teste de Tukey).

Os níveis de IFN- γ secretados por células esplênicas de camundongos vacinados, frente ao estímulo com APTX, foram crescentes no decorrer do tempo e significativamente superiores aos verificados nos grupos controles. Durante as primeiras 24 horas de incubação, células esplênicas de camundongos vacinados produziram IFN- γ em níveis correspondentes ao dobro dos verificados em células de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e ao quadruplo dos produzidos por células provenientes de animais inoculados somente com PBS (**Figura 9A e D**). Essa diferença aumentou no decorrer do tempo, pois após 48 e 72 horas de incubação, células esplênicas de animais imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA produziram concentrações 4 e 7 vezes maiores de IFN- γ , respectivamente, em relação às células dos camundongos inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (**Figura 9B, C e D**). Além disso, durante esse mesmo período, células esplênicas dos camundongos vacinados produziram cerca de 11 e 9 vezes mais IFN- γ , respectivamente, do que as células de animais inoculados com PBS (**Figura 9B, C e D**).



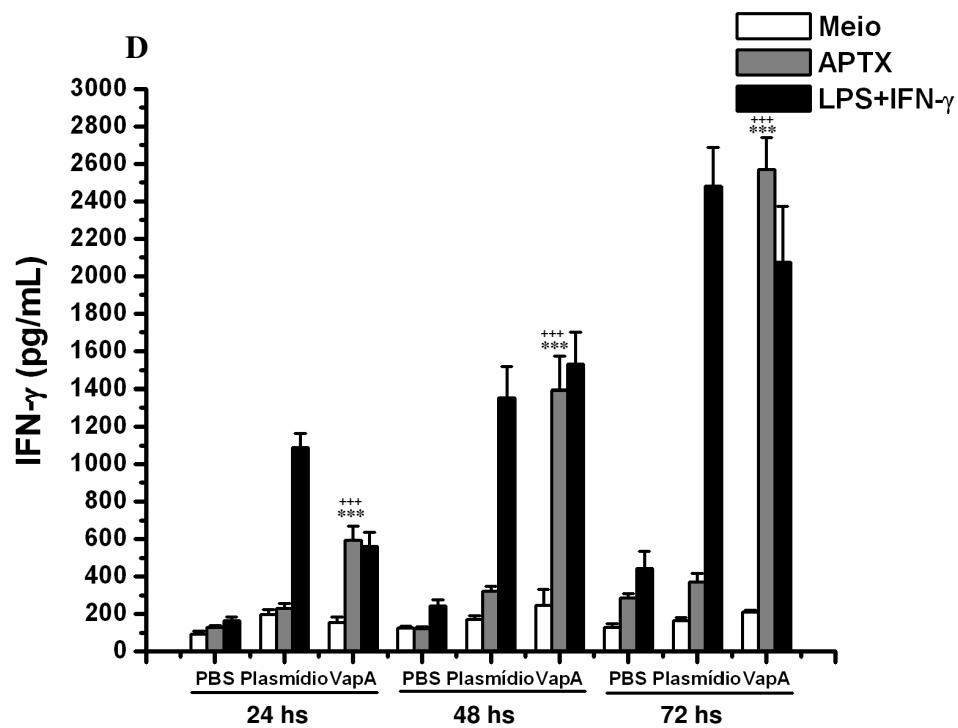
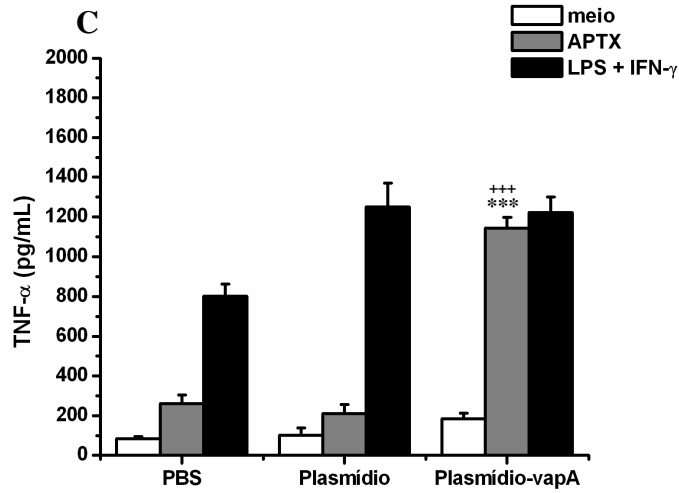
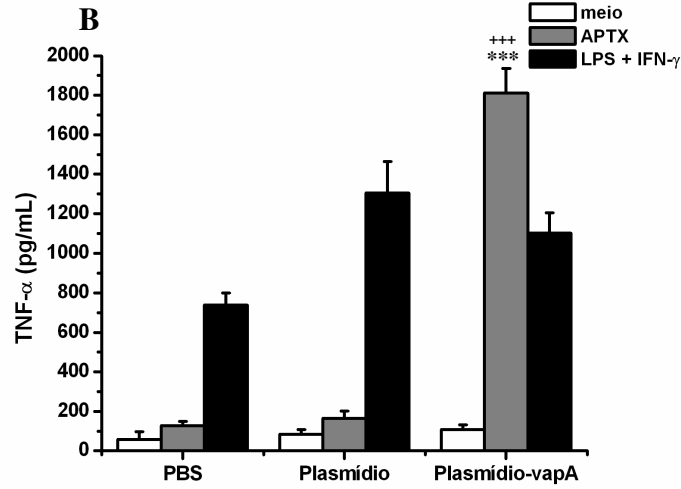
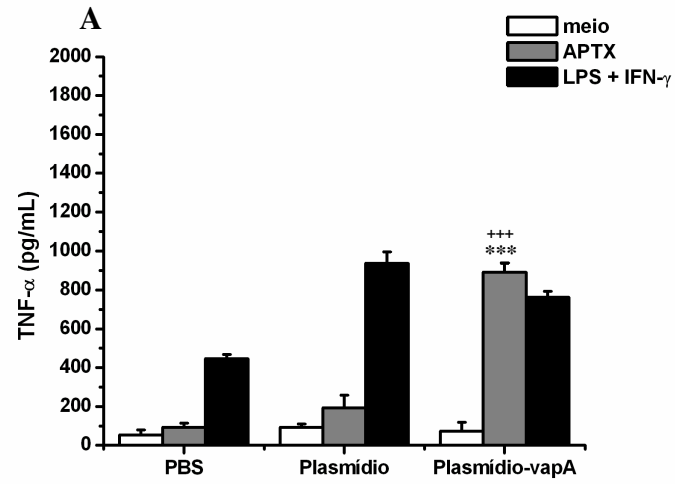


Figura 9: Produção de IFN- γ por células esplênicas. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA / VapA), com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, células esplênicas dos animais foram plaqueadas (1×10^7 células / poço) e incubadas apenas com meio ou com meio acrescido dos seguintes estímulos: LPS ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) + IFN- γ ($1 \text{ ng} / \text{mL}$) ou APTX ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas (A e D), 48 horas (B e D) e 72 horas (C e D) após incubação e a concentração de IFN- γ foi determinada por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos, onde: ***p < 0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e +++p < 0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, frente ao mesmo estímulo, durante o mesmo período de tempo (teste de Tukey).

Concentrações altas de TNF- α foram produzidas por células esplênicas de camundongos vacinados, sob estímulo de APTX, predominantemente após 48 horas de cultura (**Figura 10B e D**). Tais concentrações foram significativamente maiores do que as detectadas no sobrenadante de células dos mesmos animais, na ausência de estímulo (incubadas somente com meio) ou no sobrenadante de células de animais controles, sob estímulo com APTX, em todos os intervalos analisados (**Figura 10**).



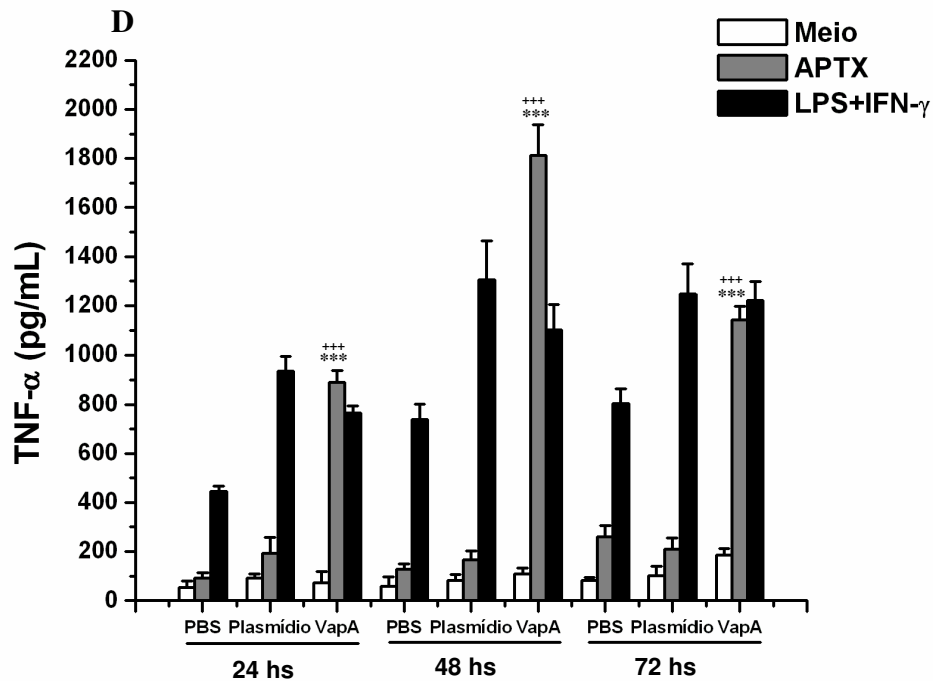
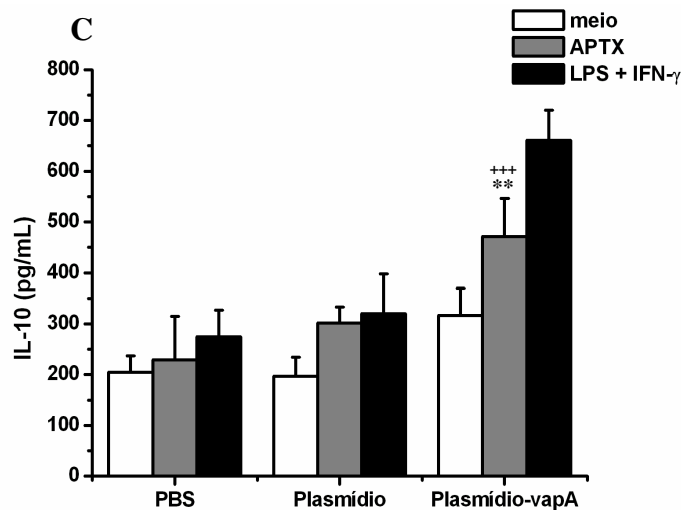
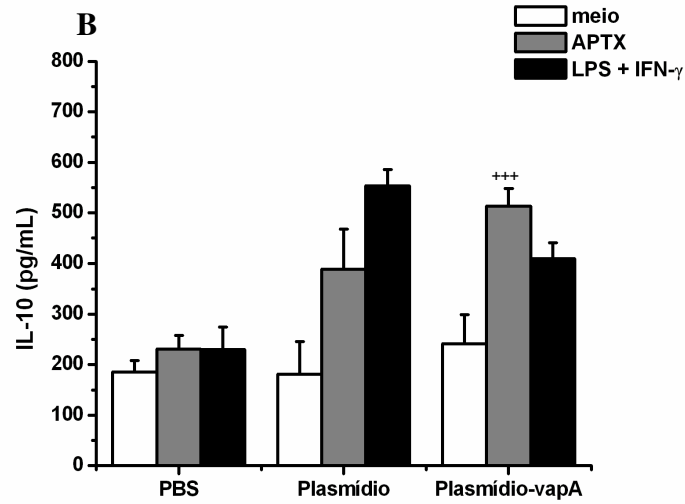
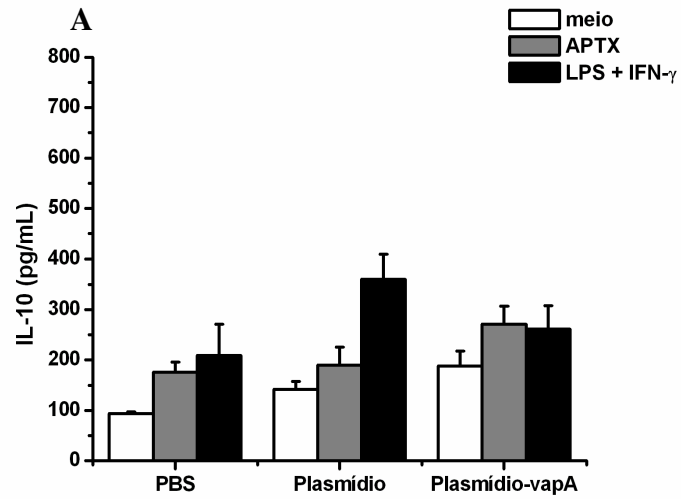


Figura 10: Produção de TNF- α por células esplênicas. Camundongos BALB/c foram inoculados, por via oral, com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA / VapA), com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, células esplênicas dos animais foram plaqueadas (1×10^7 células / poço) e incubadas apenas com meio ou com meio acrescido dos seguintes estímulos: LPS (5 μ g / mL) + IFN- γ (1 ng / mL) ou APTX (5 μ g / mL). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas (A e D), 48 horas (B e D) e 72 horas (C e D) após incubação e a concentração de TNF- α foi determinada por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos, onde: ***p<0,001 extremamente significante em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e +++p<0,001 extremamente significante em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, frente ao mesmo estímulo, durante o mesmo período de tempo (teste de Tukey).

Em relação a produção de IL-4, citocina característica de um padrão Th2 de resposta, não foi possível detectá-la no sobrenadante de cultura de células esplênicas estimuladas, em nenhum dos intervalos de tempo analisados (dados não mostrados).

No que tange à produção de IL-10, células esplênicas de animais vacinados secretaram concentrações significativamente superiores dessa citocina após 48 e 72 horas de incubação com APTX, em relação aos outros grupos (**Figura 11**).

Em conjunto, os resultados demonstrados revelam uma alta produção de TNF- α , IL-12 e IFN- γ por células de animais vacinados, indicando predomínio da resposta imune de tipo Th1 sobre a Th2. É importante ressaltar que essa resposta ocorreu de maneira controlada, evidenciada pela presença de IL-10.



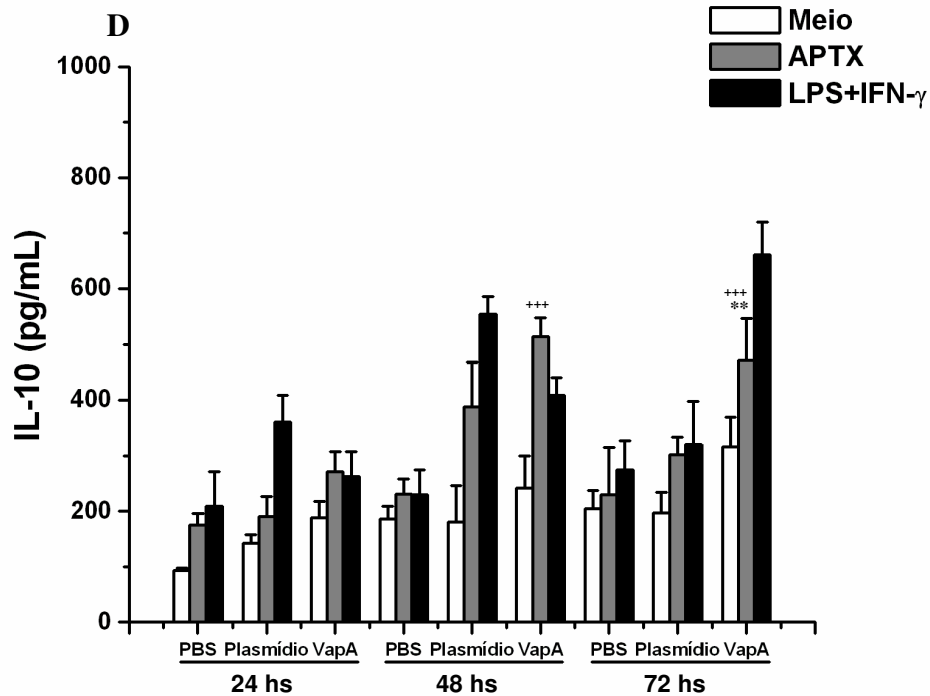


Figura 11: Produção de IL-10 por células esplênicas. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA / VapA), com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, células esplênicas dos animais foram plaqueadas (1×10^7 células / poço) e incubadas apenas com meio ou com meio acrescido dos seguintes estímulos: LPS ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) + IFN- γ ($1 \text{ ng} / \text{mL}$) ou APTX ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$). Os sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas (A e D), 48 horas (B e D) e 72 horas (C e D) após incubação e a concentração de IL-10 foi determinada por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas e é representativo de dois experimentos, onde: ** $p < 0,01$ muito significativo em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ extremamente significativo em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, frente ao mesmo estímulo, durante o mesmo período de tempo (teste de Tukey).

PARTE II: ENSAIOS REALIZADOS COM ANIMAIS VACINADOS E CONTROLES

DESAFIADOS COM *RHODOCOCCLUS EQUI VIRULENTO*

1) Detecção de citocinas em órgãos de camundongos desafiados com *R. equi*

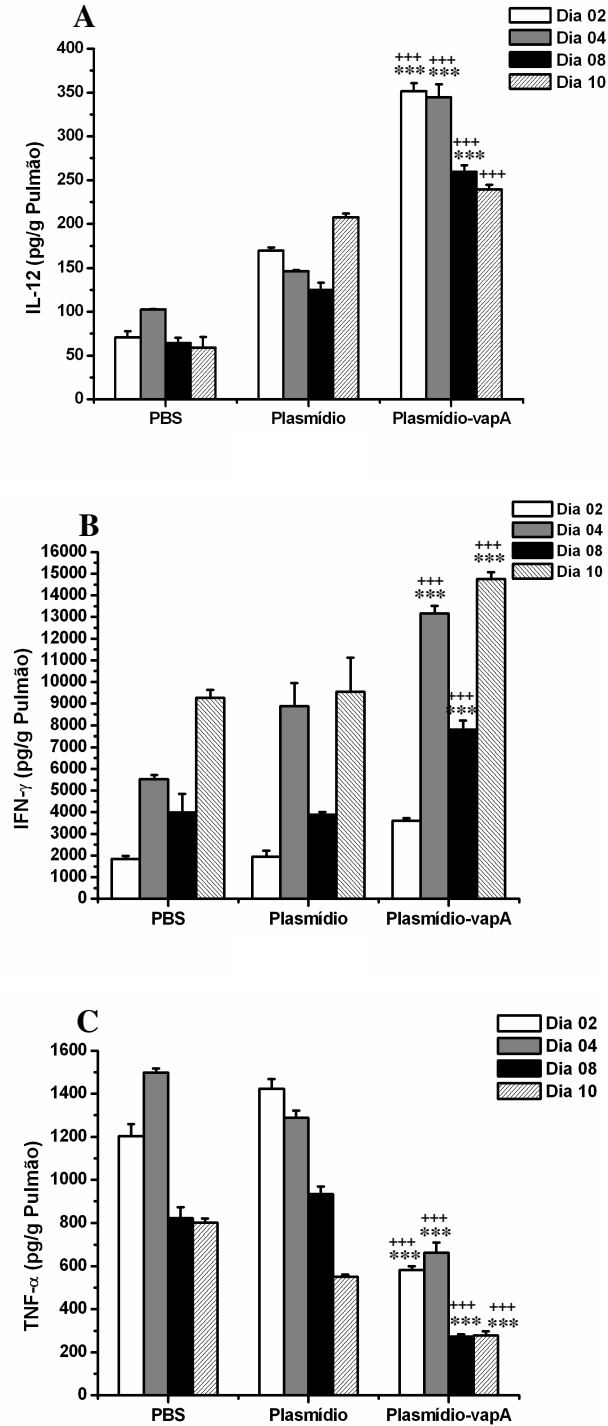
Para verificar se a infecção com a cepa virulenta de *R. equi* altera o perfil de produção de citocinas induzido pelo processo de imunização, camundongos BALB/c vacinados e camundongos controles foram desafiados, por via endovenosa, no 14º dia após a segunda imunização. Nos dias 2, 4, 8 e 10 após a infecção experimental, grupos de 4 camundongos foram sacrificados e tiveram seus órgãos (pulmão, baço e fígado) coletados para posterior dosagem de citocinas (IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10) por ELISA.

A análise do teor de citocinas no pulmão demonstrou que camundongos vacinados produziram maiores concentrações de IL-12 e IFN- γ em relação aos outros dois grupos, em todos os dias analisados (**Figura 12A e B**). Os níveis mais elevados de IL-12 foram atingidos 2 e 4 dias após o desafio e, os de IFN- γ , foram obtidos nos dias 4 e 10 (**Figura 12A e B**). A produção de TNF- α , por esse animais vacinados, foi reduzida após desafio experimental, atingindo valores pelo menos 2 vezes menores do que os proporcionados por pulmões de camundongos controles em todos os dias de infecção (**Figura 12C**).

Quanto a detecção de IL-4, verificou-se menor concentração dessa citocina nos pulmões de animais vacinados, quando comparada com a proporcionada pelos outros dois grupos de animais, predominantemente nos dias 2, 4 e 10 após o desafio (**Figura 12D**).

Os níveis de IL-10, produzidos pelos camundongos vacinados, foram significativamente superiores aos dos camundongos controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS nos dias 4 e 8 após desafio, atingindo valores aproximadamente 2 vezes maiores (no 8º dia) do que os proporcionados por pulmões de camundongos controles (**Figura**

12E). No 10º dia, não houve diferença de detecção de IL-10 nos pulmões dos animais dos três grupos experimentais (Figura 12E).



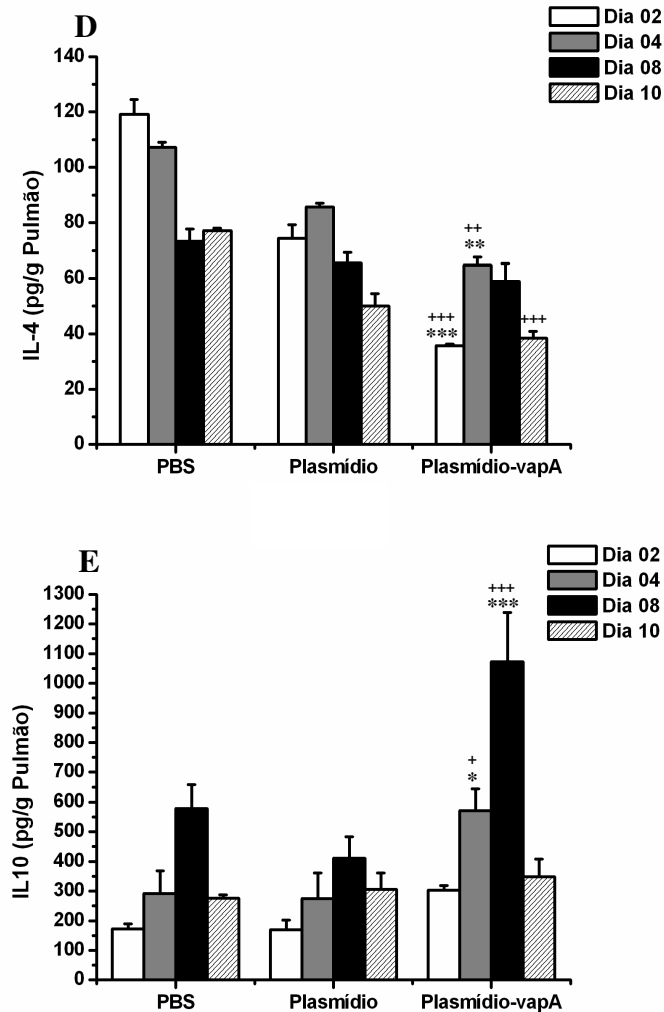


Figura 12: Detecção de citocinas no pulmão de camundongos desafiados com *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou, ainda, com 200 μ L de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via endovenosa, com 4×10^6 UFC de *R. equi* virulento. Nos dias 2, 4, 8 e 10 após a infecção, os pulmões foram coletados para a dosagem de IL-12 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das triplicatas de 4 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significativa, ** $p < 0,01$ muito significativa e * $p < 0,05$ significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137; +++ $p < 0,001$ extremamente significativa, ++ $p < 0,01$ muito significativa e + $p < 0,05$ significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, durante o mesmo período (teste de Tukey).

Em relação ao baço, foi verificado maior concentração de IL-12 nos animais vacinados, em períodos mais precoces da infecção (2 e 4 dias). No 8º dia, praticamente não houve diferença entre os três grupos de animais e, no 10º dia, a concentração de IL-12 foi estatisticamente menor em animais vacinados, quando comparados aos outros grupos experimentais (**Figura 13A**).

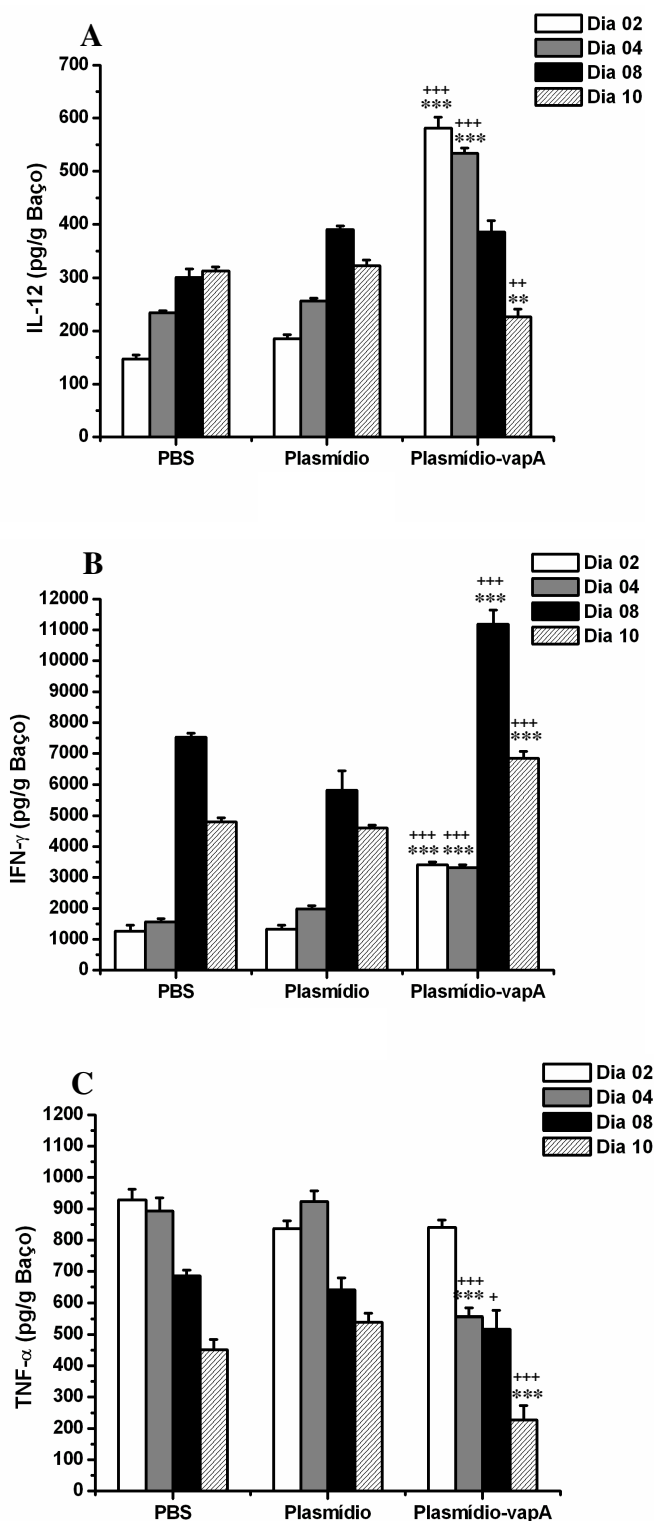
A concentração de IFN- γ , detectada no baço dos animais vacinados, foi significativamente maior do que a verificada no de animais controles, em todos os dias analisados (**Figura 13B**). No 2º dia de infecção, já havia pelo menos o dobro de IFN- γ no baço desses animais em relação aos outros dois grupos. No entanto, a maior produção de IFN- γ foi verificada 8 dias após o desafio (**Figura 13B**).

Embora no início da infecção (2º dia), os níveis de TNF- α tenham sido similares entre os grupos, a concentração de TNF- α detectada no tecido esplênico dos animais vacinados foi menor do que a verificada nos grupos controles, inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS, principalmente nos dias 4 e 10 após o desafio (**Figura 13C**).

Em todos os dias analisados, a concentração de IL-4 verificada no baço de animais vacinados foi significativamente menor do que a detectada em animais inoculados com PBS (**Figura 13D**). Em contrapartida, não houve diferença significativa entre a produção dessa citocina no baço de animais vacinados em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137, com exceção do 2º dia após o desafio, quando o nível médio de produção de IL-4 por esses animais controles foi cerca de 44% maior do que o produzido pelos camundongos vacinados (**Figura 13D**).

No que diz respeito à detecção de IL-10, as maiores concentrações da citocina foram evidenciadas no baço dos animais vacinados (**Figura 13E**); as diferenças entre o grupo que

recebeu *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA e os grupos controles foi estatisticamente significante no 8° e 10° dias após o desafio (**Figura 13E**).



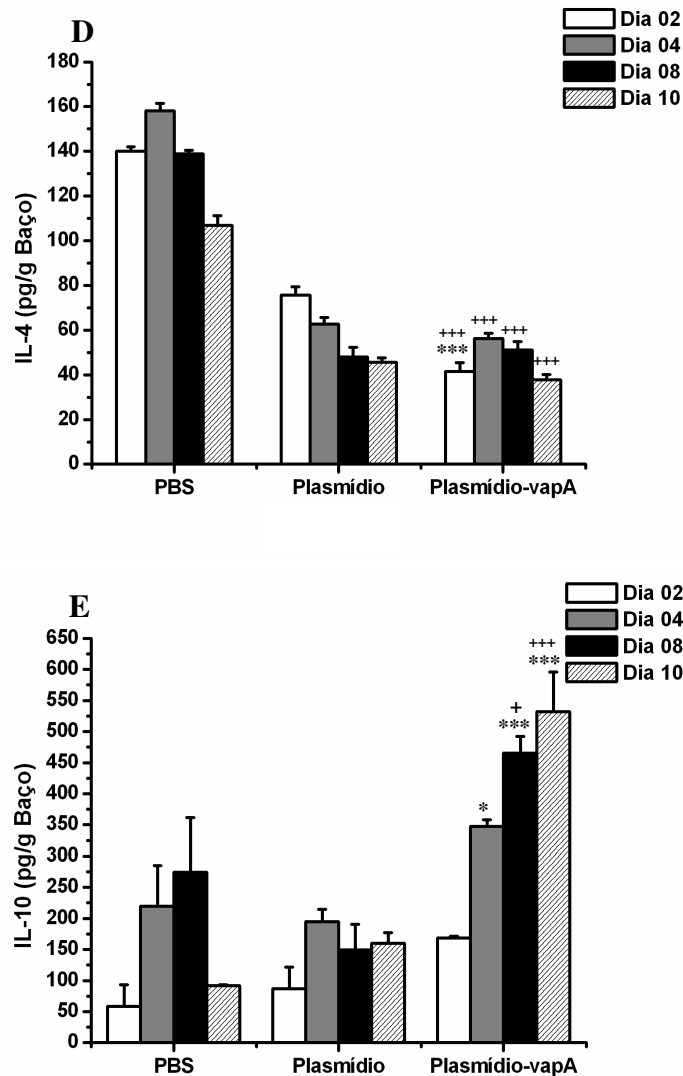


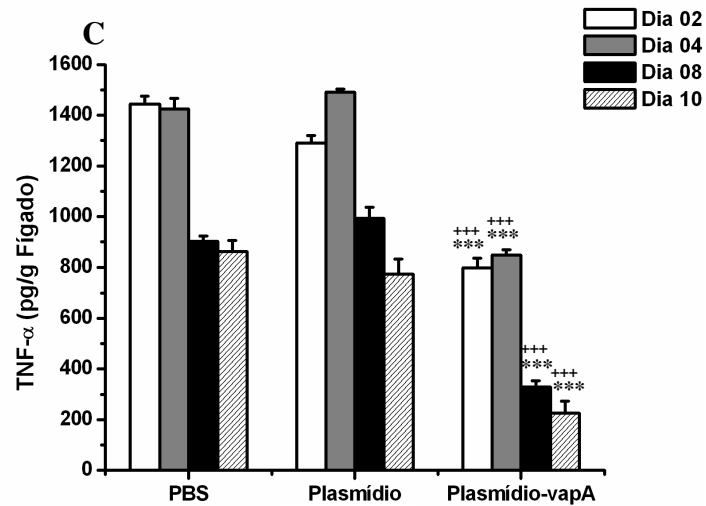
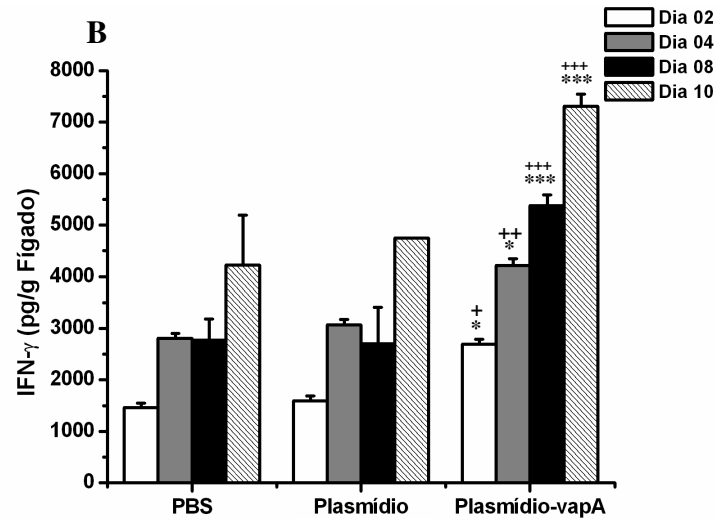
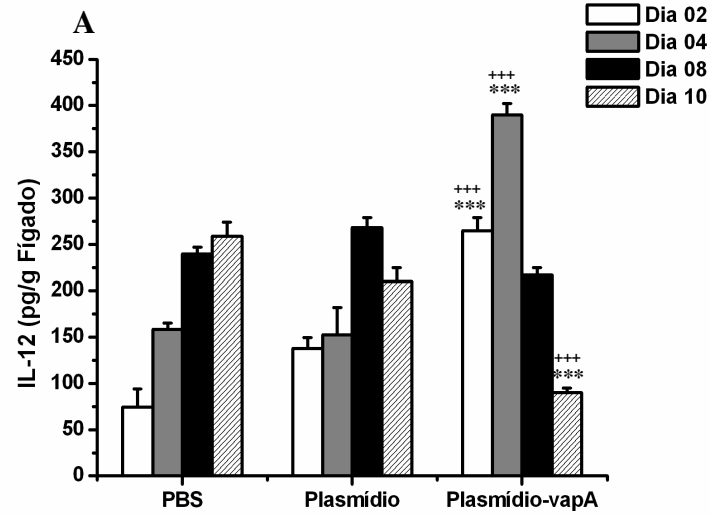
Figura 13: Detecção de citocinas no baço de camundongos desafiados com *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou, ainda, com 200 μ L de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via endovenosa, com 4×10^6 UFC de *R. equi* virulento. Nos dias 2, 4, 8 e 10 após a infecção, os baços foram coletados para a dosagem de IL-12 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das triplicatas de 4 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significativa, ** $p < 0,01$ muito significativa e * $p < 0,05$ significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137; +++ $p < 0,001$ extremamente significativa, ++ $p < 0,01$ muito significativa e + $p < 0,05$ significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, durante o mesmo período (teste de Tukey).

Assim como ocorreu no pulmão e no baço, também foi detectado maior produção de IL-12 no fígado de animais vacinados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA, em relação aos controles, nos períodos iniciais de infecção (2 e 4 dias). Em contrapartida, no 10º dia após o desafio, a produção de IL-12 foi menor no tecido hepático de animais vacinados quando comparados aos controles (**Figura 14A**).

A produção de IFN- γ também foi maior no fígado dos animais vacinados, em todo período de infecção investigado (**Figura 14B**). No início da infecção (2º dia), os níveis de IFN- γ produzidos por esses animais era de 2693 pg / g, níveis esses que aumentaram gradativamente, chegando a 7309 pg / g de fígado no 10º dia (**Figura 14B**).

As concentrações de TNF- α e IL-4, detectadas no fígado de animais vacinados, foram significativamente menores do que as proporcionadas pelos camundongos controles, em todos os dias analisados após o desafio (**Figuras 14C e D**).

A produção de IL-10, verificada no fígado de animais vacinados, foi significativamente maior do que a detectada no tecido hepático dos camundongos controles, em todo o período analisado (**Figura 14E**). No entanto, a diferença mais significativa ocorreu no 8º dia, quando a produção de IL-10 foi cerca de 3 vezes superior a do grupo inoculado com *S. enterica* Typhimurium pYA3137 e, cerca de 4 vezes superior a do grupo que recebeu apenas PBS (**Figura 14E**).



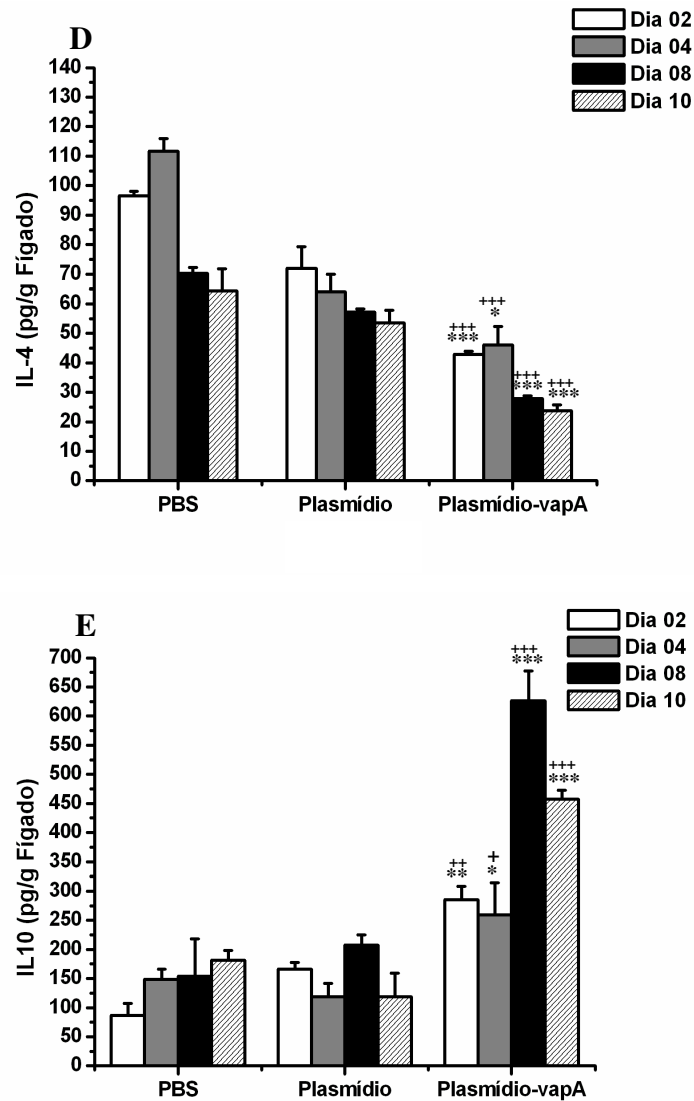


Figura 14: Detecção de citocinas no fígado de camundongos desafiados com *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídio-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídio) ou, ainda, com 200 μ L de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via endovenosa, com 4×10^6 UFC de *R. equi* virulento. Nos dias 2, 4, 8 e 10 após a infecção, os fígados foram coletados para a dosagem de IL-12 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) por ELISA. Cada barra representa a média \pm SD das triplicatas de 4 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significativa, ** $p < 0,01$ muito significativa e * $p < 0,05$ significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137; +++ $p < 0,001$ extremamente significativa, ++ $p < 0,01$ muito significativa e + $p < 0,05$ significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, durante o mesmo período (teste de Tukey).

2) Detecção de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio em órgãos de camundongos desafiados com *R. equi*

No item anterior foi demonstrado que camundongos vacinados produzem altas concentrações de IFN- γ após desafio com *R. equi* virulento. Com a finalidade de investigar o estado de ativação celular, órgãos (pulmão, baço e fígado) de animais vacinados e controles foram coletados nos dias 2, 4, 8 e 10 após a infecção experimental e utilizados para estimar a produção de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

A análise do pulmão demonstrou que os animais vacinados produziram maiores concentrações de NO, quando comparados aos grupos controles, em todos os dias analisados; apenas no 2º dia a diferença não foi estatisticamente significativa (**Figura 15A**).

Os níveis de H₂O₂ verificados nos pulmões dos animais vacinados foram significativamente superiores aos dos animais controles nos dias 2, 8 e 10 após o desafio (**Figura 15B**), sendo que as maiores diferenças ficaram evidenciadas no 8º dia. Nesse período, os valores de H₂O₂ obtidos nos pulmões de camundongos vacinados foram pelo menos 3 vezes maiores do que os proporcionados pelos controles (**Figura 15B**).

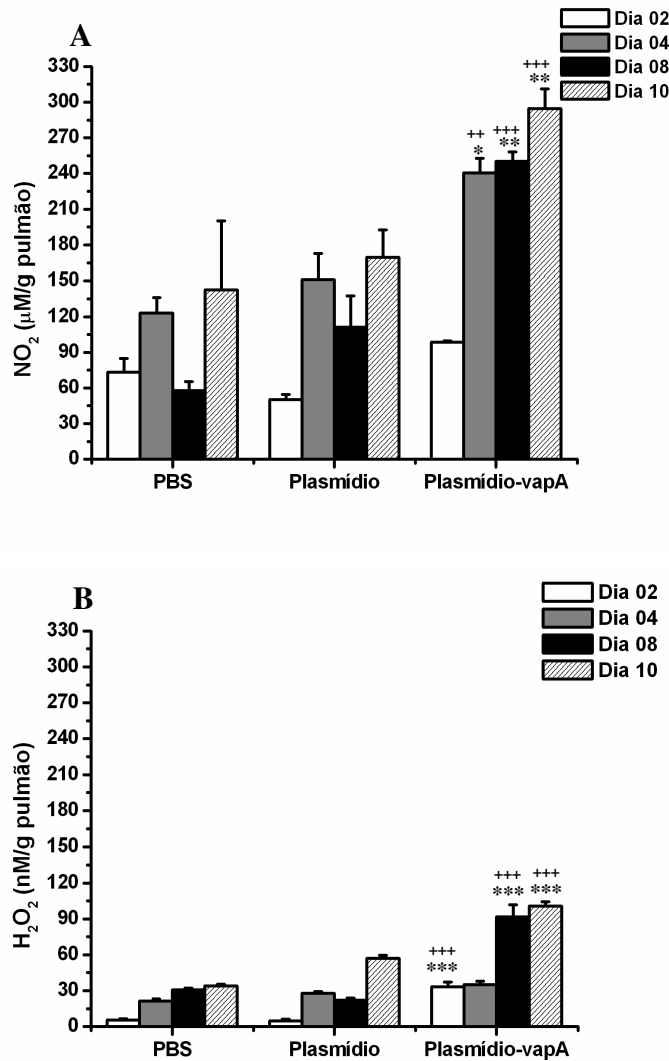


Figura 15: Detecção de NO e H₂O₂ no pulmão de camundongos desafiados com *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 µL (1x10⁹ UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou, ainda, com 200 µL de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via endovenosa, com 4x10⁶ UFC de *R. equi* virulento. Nos dias 2, 4, 8 e 10 após a infecção, os pulmões foram coletados para a dosagem de NO (A) e H₂O₂ (B). Cada barra representa a média ± SD das duplicatas de 4 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: ***p<0,001 extremamente significativa, **p<0,01 muito significativa e *p<0,05 significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137; +++p<0,001 extremamente significativa, ++p<0,01 muito significativa e +p<0,05 significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, durante o mesmo período (teste de Tukey).

As concentrações de NO detectadas no baço de animais vacinados foram maiores do que as produzidas pelos camundongos controles, em todos os períodos investigados (**Figura 16A**). No 8º dia após a infecção, os camundongos vacinados secretaram cerca de 3 e 4 vezes mais NO do que os camundongos controles, inoculados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137 ou com PBS, respectivamente (**Figura 16A**).

Quanto a produção de H₂O₂, os animais vacinados produziram quantidades significativamente superiores nos dias 4, 8 e 10 após a infecção experimental; a maior diferença ocorreu no 8º dia (**Figura 16B**), assim como demonstrado na detecção de NO. Nesse dia, níveis 4 vezes maiores de produção de H₂O₂ foram verificados no baço dos animais vacinados, quando comparados aos controles (**Figura 16B**).

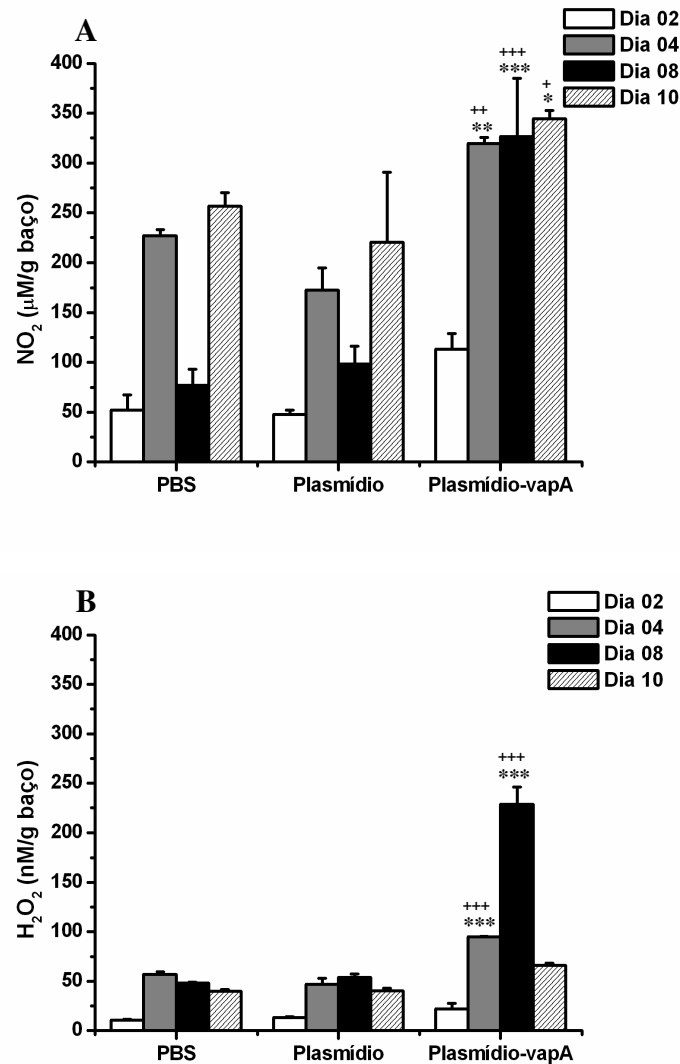


Figura 16: Detecção de NO e H₂O₂ no baço de camundongos desafiados com *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 µL (1x10⁹ UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou, ainda, com 200 µL de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via endovenosa, com 4x10⁶ UFC de *R. equi* virulento. Nos dias 2, 4, 8 e 10 após a infecção, os baços foram coletados para a dosagem de NO (A) e H₂O₂ (B). Cada barra representa a média ± SD das duplicatas de 4 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: ***p<0,001 extremamente significativa, **p<0,01 muito significativa e *p<0,05 significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137; +++p<0,001 extremamente significativa, ++p<0,01 muito significativa e +p<0,05 significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, durante o mesmo período (teste de Tukey).

Em relação ao fígado, verificou-se que os animais vacinados produziram níveis significativamente superiores de NO, em comparação aos controles, nos períodos mais tardios de infecção (8 e 10 dias) (**Figura 17A**).

Os níveis de H₂O₂ produzidos também foram superiores no fígado de camundongos vacinados, em relação aos controles, embora no 2º dia a diferença não tenha sido significativa entre os três grupos (**Figura 17B**).

Em conjunto, os resultados demonstraram que camundongos vacinados produzem níveis superiores de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, em comparação com os controles, após desafio experimental com a cepa virulenta de *R. equi*.

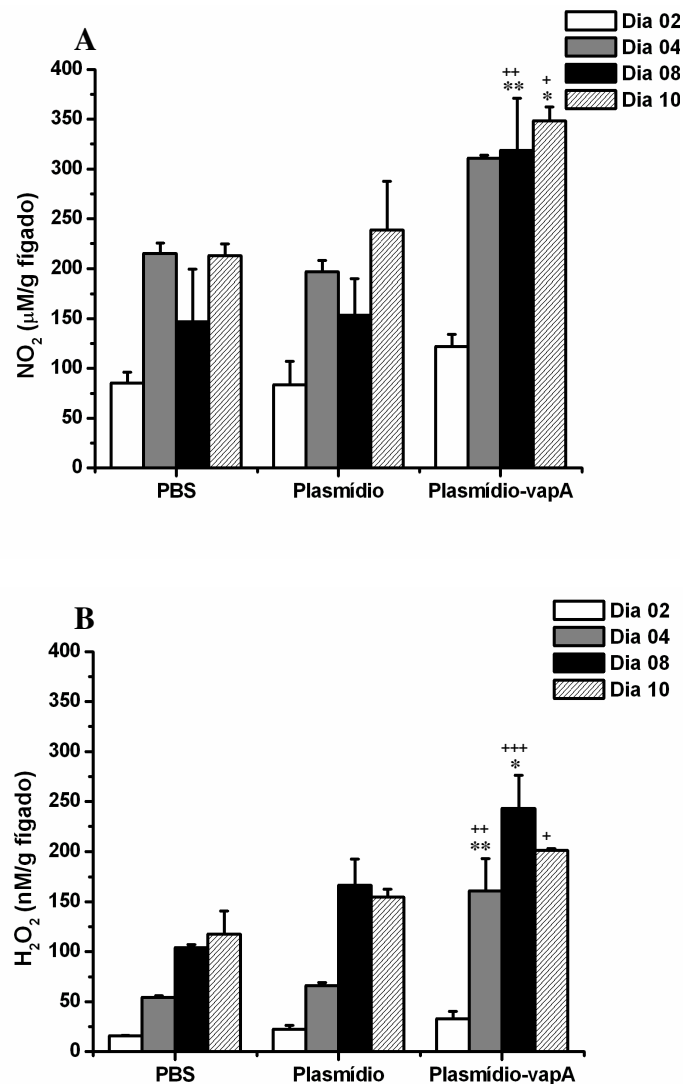


Figura 17: Detecção de NO e H₂O₂ no fígado de camundongos desafiados com *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 µL (1x10⁹ UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou, ainda, com 200 µL de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via endovenosa, com 4x10⁶ UFC de *R. equi* virulento. Nos dias 2, 4, 8 e 10 após a infecção, os fígados foram coletados para a dosagem de NO (A) e H₂O₂ (B). Cada barra representa a média ± SD das duplicatas de 4 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: ***p<0,001 extremamente significativa, **p<0,01 muito significativa e *p<0,05 significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137; +++p<0,001 extremamente significativa, ++p<0,01 muito significativa e +p<0,05 significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS, durante o mesmo período (teste de Tukey).

PARTE III: ENSAIOS REALIZADOS COM ANIMAIS VACINADOS E CONTROLES

DESAFIADOS OU NÃO COM *RHODOCOCCUS EQUI* VIRULENTO

1) Análise da produção de GATA e T-bet por PCR em tempo real

Com intuito de confirmar a predominância do padrão Th1 da resposta induzida pela vacinação, quantificou-se a expressão em células esplênicas dos fatores de transcrição T-bet, relacionado à resposta Th1 e GATA-3, relacionado à resposta Th2.

Animais imunizados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA expressaram menos GATA-3 do que os animais controles (**Figura 18A**). A expressão relativa de GATA-3 em animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137 ou com PBS atingiu valores de 2,8 e 4,49 respectivamente, enquanto nos camundongos vacinados o valor foi de apenas 1,32 (**Figura 18A**).

A análise da expressão relativa de T-bet revelou resultados opostos, já que o dobro de mensagem foi verificada no baço de animais vacinados em relação aos controles (**Figura 18B**). Dessa maneira, reforçam-se as evidências de que a imunização com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium expressando VapA gera resposta imune predominantemente de padrão Th1.

No baço de camundongos desafiados não foi detectada diferença significativa na expressão relativa de mensagem para GATA-3 entre os três grupos de animais (**Figura 19A**). Em contrapartida, foi verificada maior expressão relativa de T-bet no tecido esplênico de camundongos vacinados, quando comparados aos controles (**Figura 19B**), sugerindo que a imunidade Th1 persiste após a infecção.

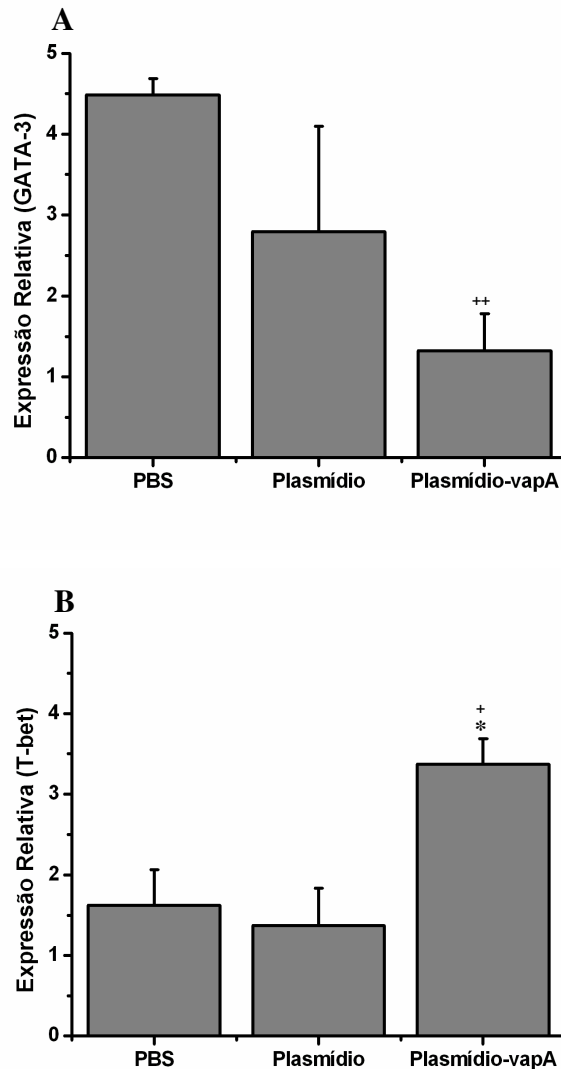


Figura 18: Quantificação relativa de mensagem para os fatores de transcrição GATA-3 e T-bet no baço de animais vacinados e controles. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μL (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou, ainda, com 200 μL de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram sacrificados e os baços coletados para extração de RNA total. Após conversão do RNA em cDNA, os níveis de expressão para GATA-3 (A) e T-bet (B) foram quantificados por PCR em tempo real. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas de 3 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: * $p < 0,05$ significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137; ⁺⁺ $p < 0,01$ muito significativa e [†] $p < 0,05$ significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).

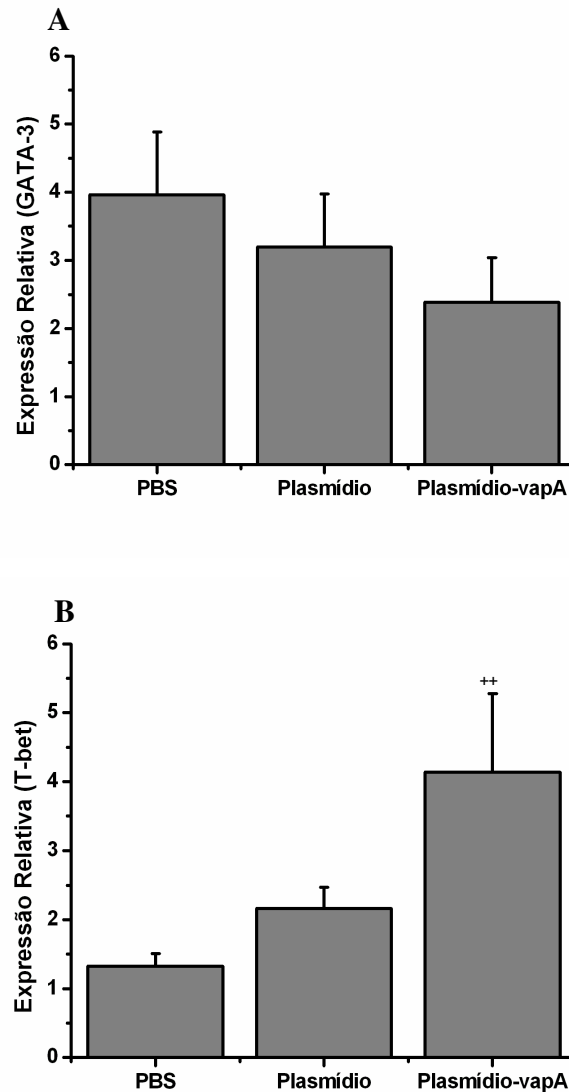


Figura 19: Quantificação relativa de mensagem para os fatores de transcrição GATA-3 e T-bet no baço de animais vacinados e controles, após desafio com *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou, ainda, com 200 μ L de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via endovenosa, com 4×10^6 UFC de *R. equi* virulento. No 8º dia após a infecção, os animais foram sacrificados e os baços coletados para extração de RNA total. Após conversão do RNA em cDNA, os níveis de expressão para GATA-3 (A) e T-bet (B) foram quantificados por PCR em tempo real. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas de 3 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: ^{**}p<0,01 muito significativo em relação ao grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).

2) Proliferação de células esplênicas de camundongos vacinados e controles sob estímulo antígeno-específico

A fim de avaliar se os camundongos vacinados geraram células imunes antígeno-específicas, verificou-se a capacidade de proliferação de células esplênicas desses animais frente ao antígeno específico (APTX). Para tanto, células do baço de camundongos vacinados, bem como de animais controles, foram coletadas e cultivadas na presença dos seguintes estímulos: APTX (5 µg / mL), ConA (controle positivo - 2 µg / mL) ou apenas meio (controle negativo), durante 72 horas a 37°C. Células esplênicas provenientes de animais vacinados e controles, desafiados com *R. equi* virulento, foram igualmente cultivadas e estimuladas.

Os níveis de incorporação de timidina tritiada revelaram que o processo de imunização foi capaz de gerar células esplênicas específicas, que proliferaram frente ao estímulo com APTX cerca de 4 vezes mais do que as células de animais controles (**Figura 20A**). Esse efeito promovido pela imunização foi potencializado em animais que foram, adicionalmente, infectados com *R. equi*; células de animais vacinados e desafiados, frente ao estímulo com APTX, incorporaram quase o dobro de timidina tritiada em relação a células de animais apenas vacinados (**Figura 20B**). Como esperado, células esplênicas obtidas a partir de animais controles, mesmo infectados, não proliferaram sob estímulo de APTX (**Figura 20**).

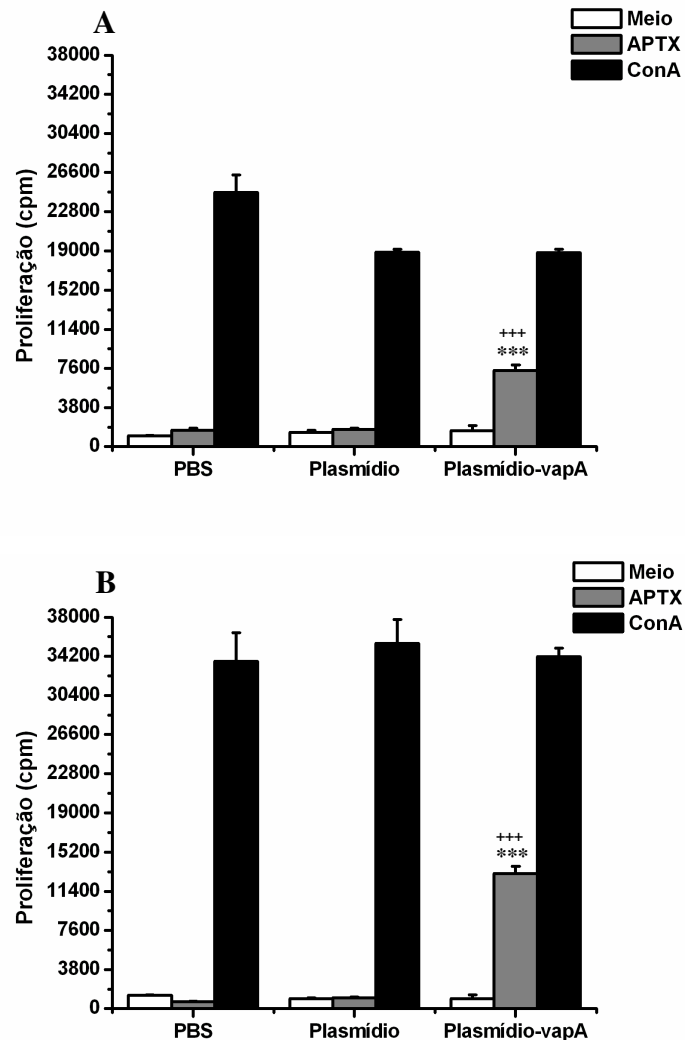


Figura 20: Resposta proliferativa de células esplênicas frente ao estímulo com APTX. (A) Células esplênicas provenientes de camundongos imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) e de camundongos controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), foram obtidas 14 dias após a última imunização, plaqueadas (1×10^7 cél / mL) e cultivadas na presença de ConA ($2 \mu\text{g} / \text{mL}$), de APTX ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) ou somente de meio por 72 horas. (B) Células esplênicas provenientes de camundongos imunizados (Plasmídeo-vapA) e de camundongos controles (Plasmídeo ou PBS), desafiados com *R. equi*, foram obtidas 8 dias após o desafio, plaqueadas (1×10^7 cél / mL) e cultivadas na presença de ConA ($2 \mu\text{g} / \text{mL}$), de APTX ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) ou somente de meio por 72 horas. A proliferação celular foi determinada pela incorporação de ^3H -timidina (cpm). Cada barra representa a média \pm SD das triplicatas de 3 animais por grupo e é representativo de três experimentos, onde: $***p < 0,001$ extremamente significativo em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e $***p < 0,001$ extremamente significativo em relação ao grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).

3) Avaliação das populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ presentes no baço de animais imunizados e desafiados com *R. equi*

Visando avaliar a frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em células esplênicas de camundongos vacinados e controles, procedeu-se a análise da expressão de marcadores de superfície, por citometria de fluxo. Essa análise também incluiu células de camundongos que, além de imunizados, foram desafiados com *R. equi*.

Não houve diferença entre o número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ encontradas no baço de camundongos vacinados e de camundongos controles (**Figura 21A**). No entanto, após desafio com *R. equi* virulento, dentre as células dos animais vacinados havia 45,7% e 27,8% de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, respectivamente. Em contrapartida, após a infecção experimental, camundongos controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 apresentaram 28% de células T CD4⁺ e 17% de células T CD8⁺; os controles que receberam PBS apresentaram apenas 24,7% e 16,3% de células T CD4⁺ e T CD8⁺, respectivamente (**Figura 21B**).

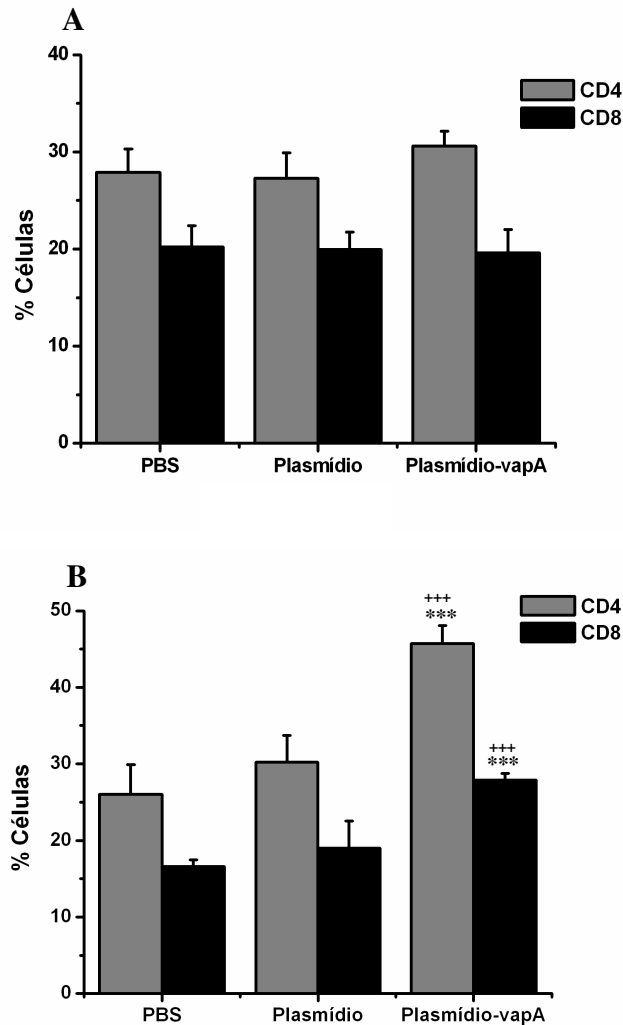


Figura 21: Frequência relativa de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em células esplênicas de animais vacinados, desafiados ou não com *R. equi* virulento, em relação aos controles. (A) Células esplênicas (1×10^7 cél / mL) provenientes de camundongos imunizados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) e de camundongos controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), obtidas 14 dias após a última imunização, foram incubadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 e fixadas em formalina 10%. (B) Células esplênicas (1×10^7 cél / mL) provenientes de camundongos imunizados (Plasmídeo-vapA) e de camundongos controles (Plasmídeo ou PBS), coletadas 8 dias após desafio com *R. equi*, foram incubadas com anticorpo anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 e fixadas em formalina 10%. A avaliação da porcentagem de células positivas para cada um dos marcadores foi feita por citometria de fluxo. Cada barra representa a média \pm SD das triplicatas de 3 animais por grupo e é representativo de três experimentos, onde: *p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137 e ⁺⁺⁺p<0,001 extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).**

4) Avaliação das populações de células B (CD19⁺) e T (CD3⁺) presentes no baço de animais imunizados e desafiados com *R. equi*

A frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em camundongos vacinados e desafiados com *R. equi* virulento foi maior do que em camundongos controles. Uma vez que células T CD4⁺, além de promoverem a ativação de macrófagos via IFN- γ , também induzem linfócitos B a secretarem anticorpos opsonizantes de alta afinidade, avaliou-se, por citometria de fluxo, a frequência relativa de células B (CD19⁺) e T (CD3⁺) nas células esplênicas de animais vacinados e desafiados com *R. equi*.

A frequência relativa de células T (CD3⁺) e B (CD19⁺) nas preparações de células esplênicas dos camundongos vacinados foi significativamente superior à detectada nas preparações provenientes de animais controles (**Figura 22**).

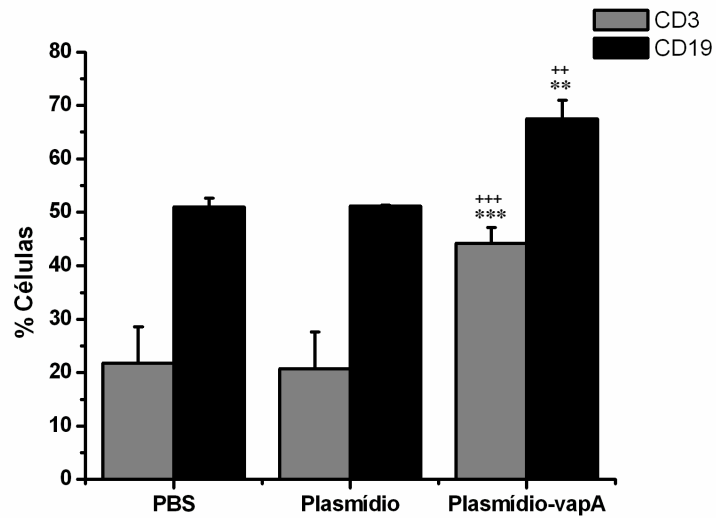


Figura 22: Frequência relativa de linfócitos T (CD3⁺) e B (CD19⁺) em células esplênicas de animais vacinados e desafiados com *R. equi* virulento, em relação aos controles. Células esplênicas (1×10^7 cél / mL) provenientes de camundongos imunizados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) e de camundongos controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), desafiados com *R. equi*, obtidas oito dias após infecção, foram incubadas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD19 e fixadas em formalina 10%. A avaliação da porcentagem de células positivas para cada um dos marcadores foi feita por citometria de fluxo. Cada barra representa a média \pm SD das triplicatas de 3 animais por grupo e é representativo de três experimentos, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significante e ** $p < 0,01$ muito significante em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137; +++ $p < 0,001$ extremamente significante e ++ $p < 0,01$ muito significante em relação ao grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).

5) Avaliação das populações de células T CD4⁺CD25⁺ presentes no baço de animais imunizados e desafiados com *R. equi*

Caracterizou-se, por citometria de fluxo, a frequência relativa de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em células esplênicas dos camundongos vacinados e respectivos controles, desafiados ou não com *R. equi* virulento.

Como mostra a **figura 23**, a frequência relativa de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ na preparação de células esplênicas de camundongos vacinados foi significativamente maior do que a encontrada em camundongos controles, tanto na condição de desafiados como não desafiados com a cepa virulenta de *R. equi*.

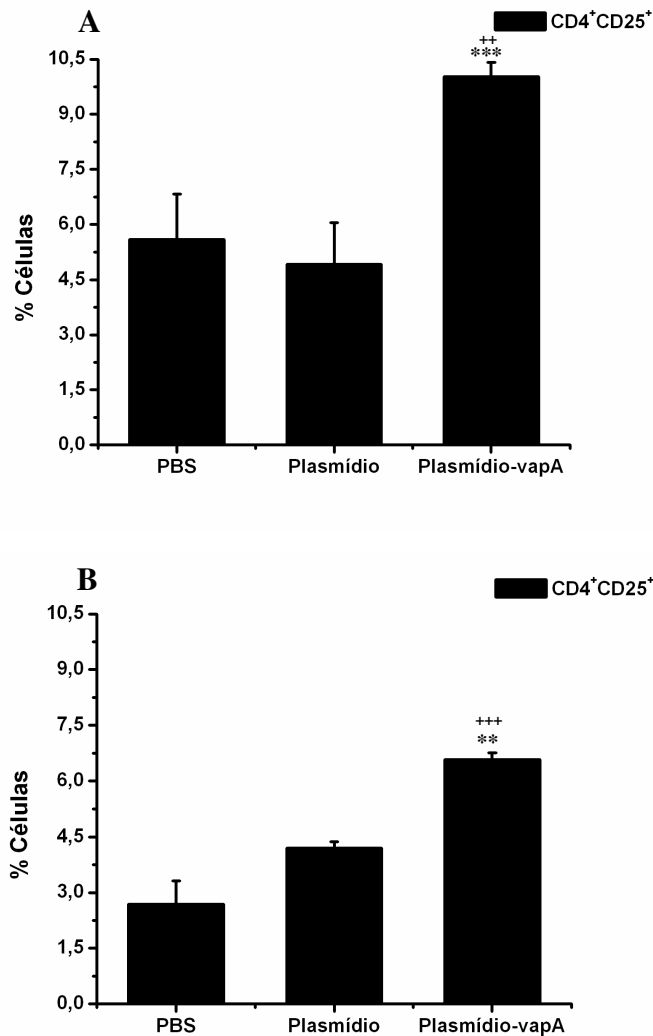


Figura 23: Frequência relativa de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em células esplênicas de camundongos vacinados e controles, desafiados ou não com *R. equi* virulento. (A) Células esplênicas (1×10^7 cél / mL) provenientes de camundongos imunizados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) e de camundongos controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137 (Plasmídeo) ou com PBS (PBS), obtidas 14 dias após a última imunização, foram incubadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 e fixadas em formalina 10%. (B) Células esplênicas (1×10^7 cél / mL) provenientes de camundongos imunizados (Plasmídeo-vapA) e de camundongos controles (Plasmídeo ou PBS), todos desafiados com *R. equi*, foram obtidas 8 dias após a infecção. Seguiu-se incubação com anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 e fixação em formalina 10%. A avaliação da porcentagem de células positivas para ambos os marcadores foi determinada por citometria de fluxo. Cada barra representa a média \pm SD das triplicatas de 3 animais por grupo e é representativo de três experimentos, onde: *p<0,001 extremamente significativa e **p<0,01 muito significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137; +++p<0,001 extremamente significativa e ++p<0,01 muito significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).**

6) Análise da produção de TGF- β e Foxp3 por PCR em tempo real

Com intuito de verificar se o aumento do número de células T CD4⁺CD25⁺ nos animais vacinados estaria relacionado ao desenvolvimento de resposta imunitária com perfil regulatório, quantificou-se a expressão do fator de transcrição Foxp3 e da citocina TGF- β em células esplênicas.

Animais imunizados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA expressam níveis semelhantes de Foxp3 e de TGF- β aos verificados em animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137 ou com PBS (dados não mostrados).

Em contrapartida, após o desafio experimental, células esplênicas obtidas de camundongos vacinados apresentaram cerca de três e quatro vezes mais mensagem para Foxp3 do que o verificado em animais controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137 ou com PBS, respectivamente (**Figura 24A**).

A análise da expressão relativa de TGF- β proporcionou resultado coerente com o de Foxp3, uma vez que pelo menos o quádruplo de mensagem para essa citocina foi verificado no baço de animais vacinados em relação aos outros grupos (**Figura 24B**).

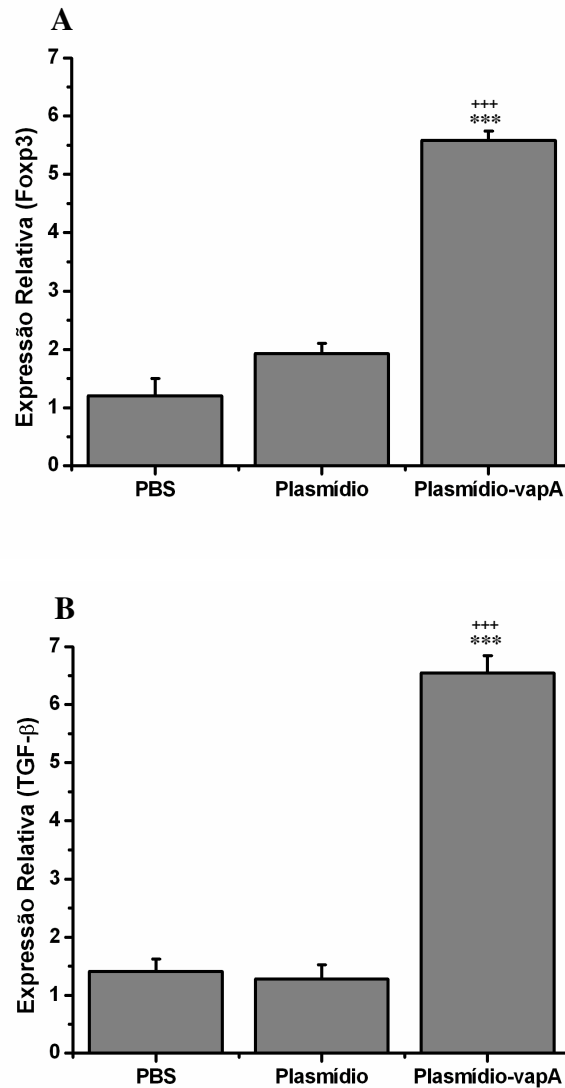
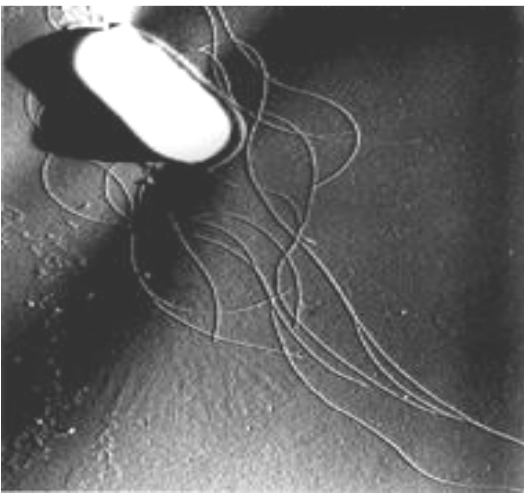


Figura 24: Quantificação relativa de mensagem para o fator de transcrição Foxp3 e para a citocina TGF-β no baço de animais vacinados e desafiados com *R. equi*. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (Plasmídeo-vapA) ou de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (Plasmídeo) ou, ainda, com 200 μ L de PBS (PBS), nos dias 0 e 14. Quatorze dias após a segunda imunização, os animais foram desafiados, por via endovenosa, com 4×10^6 UFC de *R. equi* virulento. No 8º dia após o desafio, os animais foram sacrificados e os baços coletados para extração de RNA total. Após conversão do RNA em cDNA, os níveis de expressão para Foxp3 (A) e TGF-β (B) foram quantificados por PCR em tempo real. Cada barra representa a média \pm SD das duplicatas de 3 animais por grupo e é representativo de dois experimentos, onde: *** $p < 0,001$ extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 e ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ extremamente significativa em relação ao grupo de animais inoculados com PBS (teste de Tukey).

D H S C U S S Ã O



DISCUSSÃO

Rhodococcus equi, como principal agente etiológico de pneumonia em potros com menos de 6 meses de vida, gera um dos principais problemas de saúde nesses animais. O tratamento, baseado em eritromicina e rifampicina, tem alto custo, é demorado e pode ter efeitos adversos e nem sempre é eficaz (Giguere & Prescott, 1997), ressaltando-se que já foram descritas amostras de *R. equi* resistentes à rifampicina (Takai *et al.*, 1997). Os prejuízos econômicos advindos de infecções por *R. equi*, são altos, em função da alta mortalidade acarretada em animais que, muitas vezes, são de alto valor. Por tais problemas, vários estudos voltam-se para o desenvolvimento de vacinas efetivas contra a rodococose (Prescott *et al.*, 1997; Cauchard *et al.*, 2004; Takai *et al.*, 1999; Taouji *et al.*, 2004; Pei *et al.*, 2007).

Preparações vacinais já testadas, usando *R. equi* avirulento ou bactérias mortas, não induziram resposta imunológica protetora (Takai *et al.*, 1999). Em contrapartida, a administração de *R. equi* virulento, por via oral ou endovenosa, resultou em proteção tanto de potros como de camundongos, respectivamente (Chirino-Trejo *et al.*, 1987; Takai *et al.*, 1999). No entanto, essa estratégia não pode ser aplicada como procedimento vacinal, devido ao alto risco de provocar doença nos animais, além de promover a contaminação ambiental.

A proteína VapA corresponde ao principal fator de virulência de *R. equi* (Jain *et al.*, 2003). Muitos trabalhos ressaltam sua importância como imunógeno, pois acredita-se que a ativação de uma resposta específica para essa proteína induza proteção ou amenize a doença (Taouji *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2003). Procedimentos experimentais de imunização, que utilizam peptídeos sintéticos representativos de epítomos de VapA (Taouji *et al.*, 2004), bem como a administração de vacinas de DNA expressando o gene *vapA* (Haghighi & Prescott, 2005; Mealey *et al.*, 2007), resultaram em resposta imunitária específica, que conferiu, entretanto, variados graus de proteção.

Linhagens atenuadas de *S. enterica* são boas carreadoras de proteínas heterólogas para células do sistema imunológico, capazes de induzir resposta protetora tanto contra *Salmonella sp* como contra o patógeno doador do antígeno (Sirard *et al.*, 1999).

Nosso grupo de pesquisa (Oliveira *et al.*, 2007), em colaboração com o Dr. Marcelo Brocchi (Instituto de Biologia, UNICAMP), isolou o gene *vapA* da cepa virulenta de *R. equi* ATCC33701 e clonou esse gene no plasmídio pYA3137, pertencente ao sistema letal balanceado *asd*. A seguir, os plasmídios pYA3137*vapA* e pYA3137 vazio foram transferidos, por transdução, para organismos da linhagem de *S. enterica* Typhimurium χ 3987. A linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 obtida expressou a proteína VapA de *R. equi*. A imunização de camundongos BALB/c, por via oral, com essa linhagem de *Salmonella*, resultou em colonização e persistência bacteriana nos seus órgãos linfóides. Frente ao desafio com dose subletal de *R. equi*, houve *clearance* bacteriano eficiente nos órgãos (pulmão, baço e fígado), significativamente superior ao verificado em camundongos controles (inoculados com PBS ou com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 carregando apenas o plasmídio pYA3137). Além disso, a taxa de sobrevivência de camundongos vacinados foi significativamente superior a de animais controles, quando desafiados com doses letais de *R. equi*. Esses resultados demonstraram que a imunização oral, com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium expressando VapA, confere proteção frente ao desafio com *R. equi* virulento em modelo murino de infecção e, fundamentaram nossa busca de avaliar o padrão de resposta imune específica para *R. equi*, desencadeada pelo processo de vacinação.

Embora se atribua à imunidade celular o papel mais importante na eliminação de *R. equi* (Kanaly *et al.*, 1993), o desenvolvimento de resposta humoral é relevante na proteção contra rodococose (Fernandez *et al.*, 1997). Anticorpos formados a partir de processos de imunização,

atuam como opsoninas contra componentes capsulares de *R. equi* (Becú *et al.*, 1997; Hooper *et al.*, 2001), aumentando significativamente a morte bacteriana mediada por macrófagos (Hietala & Ardans, 1987). Além disso, a redução da morbidade e mortalidade decorrente da transferência de plasma hiperimune evidencia a importância de anticorpos na proteção contra a bactéria (Meijer & Prescott, 2004).

O procedimento de imunização de camundongos com a linhagem vacinal de *Salmonella* expressando VapA resultou na produção de altos títulos de IgG antígeno-específicas, predominantemente de isotipo IgG2a. Essa observação é coerente com relatos anteriores de que, quando administradas por via oral, linhagens vacinais de *Salmonella* geram forte resposta de anticorpos contra antígenos heterólogos (Bao & Clements, 1991; Whittle & Verna, 1997; Yang *et al.*, 2007). A maior produção de IgG2a também é coerente com a literatura, visto que a utilização de *Salmonella enterica* Typhimurium, em processos de imunização, induz preferencialmente resposta imunitária do tipo Th1 e protege camundongos contra infecção por *Leishmania major* (Lange *et al.*, 2004). Carreando ovalbumina (OVA) como antígeno heterólogo, a administração de *S. enterica* Typhimurium resultou em produção de IgG1 e IgG2a antígeno-específicas; também nesse caso, o título de IgG2a foi superior ao de IgG1 (Bachtiar *et al.*, 2003). A imunização de camundongos com *S. Typhimurium*, expressando KatA de *Helicobacter pylori*, fez com que, frente ao desafio, houvesse importante aumento das concentrações séricas de IgG2a, em relação aos grupos controles (Chen *et al.*, 2003).

Rhodococcus equi, assim como a grande maioria dos patógenos humanos e veterinários, necessita transitar pelas mucosas nas fases iniciais da infecção (Levine *et al.*, 1983; Medina *et al.*, 1999). Os tecidos linfóides associados à mucosa (MALT) do trato gastrointestinal, respiratório e genital atuam como barreiras protetoras, dificultando a disseminação do patógeno para o sangue e tecidos mais profundos, como baço e fígado (Hobson *et al.*, 2003). Dessa forma,

a indução de uma efetiva resposta imune de mucosa é altamente desejável (Medina *et al.*, 1999; Staats *et al.*, 1994).

Sabe-se que, além de promoverem efetiva resposta imune celular e humoral, linhagens vacinais atenuadas de *Salmonella* também induzem a secreção de grandes quantidades de IgA de mucosa (Hopkins *et al.*, 1995; Kauffmann *et al.*, 2001; Shiau *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007). A análise da produção desse anticorpo pelos animais vacinados revelou que, em todo o período analisado, os camundongos imunizados com a linhagem vacinal de *Salmonella* expressando VapA produziram quantidades significativamente maiores de IgA antígeno-específica em relação aos valores verificados nas fezes de animais controles. Esses resultados são coerentes com vários relatos anteriores; estudos demonstraram que a imunização oral de galinhas utilizando linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium como carreadora do antígeno heterólogo *cjaA* de *Campylobacter jejuni* (Wyszynska *et al.*, 2004) e de camundongos utilizando *S. enterica* Typhimurium como carreadora do antígeno UreB de *Helicobacter pylori* (Yang *et al.*, 2005), gerou forte resposta imunitária de mucosa, evidenciada pela detecção de IgA antígeno-específica.

A ativação de macrófagos é crucial para o desenvolvimento de resposta protetora contra *R. equi*, pois a patogênese da infecção relaciona-se com a capacidade da bactéria de sobreviver e se multiplicar no interior dessas células (Hondalus & Mosser, 1994). As citocinas derivadas dos macrófagos exercem importante papel na regulação da resposta, bem como no início e na amplificação do processo inflamatório, essencial para a eliminação bacteriana. Por tais razões, no presente estudo foi avaliado o estado de ativação de macrófagos provenientes de camundongos vacinados, através da análise da produção de citocinas e de óxido nítrico por tais células.

Os ensaios *in vitro* demonstraram que, independentemente do intervalo de tempo analisado, concentrações significativamente superiores de óxido nítrico e das citocinas IL-12, TNF- α e IL-

IL-1 β foram produzidas por macrófagos peritoneais de camundongos vacinados em relação às verificadas em animais controles, quando estimulados com APTX, associado ou não a IFN- γ . No trabalho de Giguère & Prescott (1998) foi demonstrado que, frente a infecção com *R. equi*, independentemente da cepa ser virulenta ou avirulenta, macrófagos peritoneais murinos se tornam capazes de expressar RNAm para IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40 e TNF- α .

IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, formada por duas cadeias: p35 e p40. A cadeia p35 é constitutivamente expressa em tecidos somáticos, enquanto a cadeia p40 é induzível, produzida por macrófagos e células dendríticas, de maneira altamente regulada (Decken *et al.*, 1998). Componentes de microrganismos, ou seus produtos de secreção, como LPS, correspondem a fatores importantes na ativação celular e consequente produção de IL-12. Uma vez secretada, IL-12 atua na ativação de células T, NK e, de maneira autócrina, em macrófagos e células dendríticas (revisto por Bastos *et al.*, 2004). Na infecção por *R. equi*, IL-12 favorece a resistência, já que induz a produção de IFN- γ , promove a diferenciação de células Th0 em Th1 e constitui um elo entre a imunidade inata e a adaptativa (revisto por Trinchieri, 2003).

Está bem estabelecido que a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-12, IL-6 e TNF- α por macrófagos murinos, após desafio experimental, é de fundamental importância para promover a secreção de proteínas de fase aguda (Lalmanach & Lantier, 1999; Schutt, 1999).

A capacidade de macrófagos produzir TNF- α parece ser um passo crítico na ativação da primeira linha de defesa contra microorganismos estranhos, inclusive contra *R. equi* (Kasuga-Aoki *et al.*, 1999). Isso não é surpreendente, visto que vários patógenos desenvolvem mecanismos de virulência que interferem na produção de TNF- α pelo hospedeiro (Boland & Cornelis, 1998; Sarmiento & Appelberg, 1995).

IL-1, além de atuar como citocina pró-inflamatória que participa da resistência inicial contra várias bactérias intracelulares (Denis & Ghadirian, 1994; Langermans & Van Furth, 1994), exerce importante papel na ativação de linfócitos T. Alguns autores sugerem que a ineficiência das vacinas contra rodococose, baseadas em células mortas de *R. equi* (Nordman *et al.*, 1992; Prescott *et al.*, 1979), possa ser atribuída a uma baixa produção de IL-1 na fase inicial da resposta imunitária, tanto em camundongos como em potros. Foi demonstrado por Mitsuyama *et al.* (1990) que macrófagos infectados com *Listeria monocytogenes*, bactéria de parasitismo intracelular, secretam altos níveis de IL-1. Em contrapartida, o mesmo não foi observado quando a bactéria morta foi utilizada.

A produção por macrófagos de óxido nítrico e de citocinas, como TNF- α e IL-12, é extremamente importante na eliminação de *R. equi* (Darrah *et al.*, 2004). Em modelo murino, verificou-se que IL-12 estimula a secreção por células T de IFN- γ que, em combinação com TNF- α , induz ativação de macrófagos e morte de *R. equi*, mediada por óxido nítrico e superóxido (Darrah *et al.*, 2000).

Em nosso estudo, células esplênicas obtidas de camundongos vacinados, estimuladas *in vitro* com APTX, produziram maiores concentrações de várias citocinas (IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-10) em comparação a células provenientes do baço de camundongos controles. Ressalta-se que IL-4 não foi detectada no sobrenadante dessas células.

Em órgãos de camundongos vacinados, coletados após desafio, também foram detectadas maiores concentrações de IL-12, IFN- γ e IL-10 do que em órgãos de animais controles. No entanto, é importante ressaltar que a produção de IL-12 diminuiu com o passar do tempo de infecção, chegando a atingir níveis significativamente menores, em relação aos controles, tanto no baço como no fígado, no 10º dia após o desafio. Em trabalhos anteriores (Oliveira *et al.*,

2007), já havíamos demonstrado que o *clearance* de *R. equi* em órgãos de camundongos vacinados é mais eficiente do que o verificado em camundongos controles. Assim, a diminuição da produção de IL-12, após 10 dias de infecção, pode estar diretamente relacionada à efetiva eliminação bacteriana.

Com relação à detecção de TNF- α e de IL-4, verificou-se menor produção dessas citocinas nos órgãos dos animais vacinados em comparação com os camundongos controles, em todo o período analisado após a infecção experimental.

Demonstra-se, assim, que a imunização de camundongos com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium carreando o gene *vapA* desencadeia resposta imune predominantemente de tipo Th1. Ressalta-se que essa resposta ocorreu de maneira controlada, fato evidenciado pelos níveis de IL-10 detectados nos órgãos dos animais imunizados previamente ao desafio. Esse fato é similar ao decorrente da imunização com *S. enterica* Typhimurium carreando antígeno de *Leishmania major*: a produção predominante de IL-12 e IFN- γ por células esplênicas, acompanhada de produção de IL-10 (Lange *et al.*, 2004). Da mesma maneira, o processo de imunização oral de camundongos, com *S. enterica* Typhimurium expressando antígeno de *Helicobacter pylori*, resultou na produção de níveis aumentados de IFN- γ e de IL-10 (Yang *et al.*, 2005).

Como já citado, IL-12 induz a produção de IFN- γ , favorecendo a diferenciação de células Th1, antagonizando os efeitos de IL-4, citocina característica de um padrão Th2 de resposta. De fato, no presente estudo não houve detecção de IL-4 no sobrenadante da cultura de células esplênicas estimuladas, em nenhum dos intervalos de tempo analisados. O benefício trazido pelo antagonismo a IL-4 já havia sido demonstrado em camundongos BALB/c infectados com *R. equi* e tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-4; os animais realizaram eficiente *clearance*

bacteriano e expressaram altos níveis de RNAm para IFN- γ (Kanaly *et al.*, 1995). Há evidências de que o *clearance* de *R. equi* relaciona-se diretamente ao desenvolvimento de resposta Th1. O predomínio de resposta Th2, associado a produção de IL-4, leva a *clearance* inefetivo e desenvolvimento de lesões graves (Hines *et al.*, 1997).

A resposta proliferativa de esplenócitos de camundongos vacinados, frente a antígenos de *R. equi* (APTX), é similar à anteriormente verificada em camundongos imunizados com *Salmonella* atenuada expressando antígeno de *Toxoplasma gondii* (Cong *et al.*, 2005). Nesse caso, também houve aumento importante da produção de IFN- γ e ausência de detecção de IL-4 no sobrenadante das culturas celulares.

IFN- γ , a principal citocina Th1, é produzida por células T CD4⁺ e por células NK. Exerce função primordial na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, uma vez que ativa macrófagos, induzindo a síntese de intermediários reativos do nitrogênio. Além disso, a produção diferencial de IFN- γ influencia no isotipo de imunoglobulinas produzidas; sua presença é necessária para estimular a secreção de IgG2a e relaciona-se com a inibição da produção de IgG1 (Snapper *et al.*, 1993; Finkelman *et al.*, 1988). Dessa maneira, infere-se que a alta concentração de IFN- γ , detectada em camundongos vacinados, está implicada na produção predominante de IgG2a, em relação a IgG1 verificada nesses animais.

O aumento de células T produtoras de IFN- γ já foi associado a *clearance* pulmonar eficiente em cavalos infectados com *R. equi* virulento (Lopez *et al.*, 2002). IFN- γ estimula macrófagos a produzir TNF- α (Beutler *et al.*, 1986). Nós detectamos altos níveis de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas e de células da cavidade peritoneal. A importância desse achado pode ser avaliada com base no estudo de Kasuga-Aoki *et al.* (1999), demonstrativo de que TNF- α e IFN- γ são necessários para limitar a replicação e promover o

clearance de *R. equi* virulento. Os autores observaram que camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-TNF- α e IFN- γ morriam frente ao desafio com dose subletal de *R. equi* de cepa virulenta, ou mesmo de virulência intermediária. Outros estudos também demonstraram a importância de TNF- α e IFN- γ na resposta imunitária contra *R. equi* (Nordmann *et al.*, 1993; Kanaly *et al.*, 1995 e 1996). Recentemente, Lopez *et al.* (2008) demonstraram que a proteção conferida pela imunização de camundongos BALB/c com uma cepa atenuada de *R. equi*, associou-se à produção de IFN- γ .

A produção aumentada de TNF- α e IFN- γ , ora demonstrada em camundongos vacinados, pode justificar um achado anterior do nosso grupo referente à detecção de poucos granulomas hepáticos nesses animais, ocupando, entanto, extensa área do órgão (Oliveira *et al.*, 2007). A produção local de TNF- α e IFN- γ , por células T CD4⁺, acelera a formação do granuloma (Hänsch *et al.*, 1996). O tratamento com anti-IFN- γ diminui a infiltração linfocítica e, conseqüentemente, a área de granulomas pulmonares, formados em resposta ao antígeno PPD (proteína purificada do *Mycobacterium tuberculosis*) (Chensue *et al.*, 1995).

Apesar de TNF- α exercer importante papel na atividade microbicida contra vários patógenos (Flynn *et al.*, 1995; Langermans & Van Furth, 1994), inclusive contra *R. equi* (Kasuga-Aoki *et al.*, 1999), sabe-se que essa citocina tem atividade pró-inflamatória (Criscione & St Clair, 2002) e que sua produção exagerada associa-se a várias patologias autoimunes (Abuzakouk *et al.*, 2002). Assim, a produção de concentrações moderadas de TNF- α é de extrema importância para prevenir lesões teciduais. A eliminação da infecção pulmonar por *R. equi* avirulento já foi associada à diminuição progressiva da expressão de RNAm para TNF- α (Giguere *et al.*, 1999a).

Temos mostrado que camundongos controles desenvolvem muitos granulomas hepáticos, associados a extensas áreas de necrose, presentes tanto no fígado como no baço, além de intenso infiltrado celular pulmonar. Em contrapartida, animais vacinados apresentam poucos granulomas, não associados à necrose, e desenvolvem apenas um leve infiltrado celular (Oliveira *et al.*, 2007). Em associação a essas alterações histológicas, foram detectadas concentrações menores de TNF- α e maiores de IL-10 nos órgãos de animais vacinados em relação aos controles.

IL-10 é uma citocina produzida preferencialmente por monócitos / macrófagos e linfócitos Tr1, caracterizada por exercer função reguladora, atribuída a sua capacidade de diminuir a intensidade de respostas Th1 (Moore *et al.*, 1993; Roncarolo *et al.*, 2006). Assim, IL-10 atua sobre as células ativadas, preferencialmente macrófagos, favorecendo a finalização de reações inflamatórias e permitindo que o sistema retorne ao seu estado de repouso à medida que a infecção microbiana se resolve. Esse conhecimento respalda a hipótese de que a maior produção de IL-10, constatada em animais vacinados, seja responsável por promover a diminuição dos níveis de TNF- α e da intensidade das lesões inflamatórias teciduais provocadas pela rodococose.

Há relatos de que camundongos nocautes de IL-10 desenvolvem doença inflamatória intestinal, provavelmente como resultado da ação descontrolada de macrófagos reagindo aos microrganismos entéricos. Esses camundongos também sofrem de excessiva inflamação e lesão tecidual em resposta a irritantes químicos (Abbas *et al.*, 2003). Em modelo murino de infecção por *Toxoplasma gondii*, a produção de IL-10 é essencial para controlar a intensidade da resposta Th1, prevenindo a ocorrência de respostas exacerbadas que resultem em imunopatologias (Jankovic *et al.*, 2007).

A expressão dos fatores de transcrição T-bet, relacionado à resposta imunitária Th1 (Dong & Flavell, 2000) e GATA-3, relacionado à resposta Th2 (Lee *et al.*, 2000; Dong & Flavell, 2000), foi quantificada a fim de confirmar a maior produção de citocinas Th1 pelos animais

vacinados, desafiados ou não com *R. equi* virulento. Os resultados obtidos demonstraram que os animais vacinados expressam menos GATA-3 e mais T-bet do que os controles. Após a infecção com *R. equi*, a maior expressão de T-bet persistiu nos camundongos vacinados, quando comparados aos controles. Não houve, entretanto, diferença significativa na expressão relativa de mensagem para GATA-3, após o desafio, entre os três grupos de animais.

A expressão do fator de transcrição GATA-3 é reduzida durante a diferenciação de células para um padrão Th1 de resposta, de maneira dependente de IL-12 (Ouyang *et al.*, 1998). Esse fato reforça a idéia de que o processo de imunização com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium expressando VapA gere forte resposta imunitária Th1, embora os animais vacinados tenham produzido maiores concentrações de IL-10, em relação aos controles.

Quanto a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, ela foi maior nos órgãos de animais vacinados, em comparação com os controles, em todos os dias analisados após a infecção experimental com *R. equi* virulento. Vullo *et al.* (1998) verificaram que os monócitos e macrófagos de indivíduos saudáveis, ao serem infectados *in vitro* com *R. equi*, eliminaram a bactéria por mecanismo associado à produção de óxido nítrico.

Peróxido de hidrogênio é frequentemente encontrado após o *burst* oxidativo de macrófagos. Vários autores relatam que macrófagos ativados são capazes de eliminar patógenos intracelulares, como *Salmonella* e *R. equi*, através da produção de moléculas antimicrobianas dependente de oxigênio, como superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (Mastroeni *et al.*, 2000; Vazquez-Torres & Fang, 2001; Vazquez-Torres *et al.*, 2001; Kalupahana *et al.*, 2005; Darrah *et al.*, 2000 e 2004). Através da realização de ensaios *in vitro*, Pacelli *et al.* (1995) demonstraram que óxido nítrico pode atuar em conjunto com peróxido de hidrogênio na eliminação de *E. coli*.

Ensaio realizados *in vitro*, com a finalidade de avaliar a resposta linfoproliferativa, demonstraram que o estímulo APTX levou células esplênicas de animais vacinados a proliferarem. A imunização de cavalos utilizando uma vacina de DNA expressando VapA, também induziu aumento significativo da resposta proliferativa de linfócitos T no lavado pulmonar desses animais (Lopez *et al.*, 2003).

A vacinação de galinhas, utilizando linhagens atenuadas de *S. enterica* Typhimurium como carreadora de antígenos heterólogos, também se associou a respostas proliferativas antígeno-específicas (Du & Wang, 2005).

Há observações prévias de que o processo de imunização com linhagens vacinais de *Salmonella* carreando antígenos heterólogos estimula células T CD4⁺ e T CD8⁺ efetoras, capazes de combater a infecção causada pelo patógeno doador do antígeno (Shiau *et al.*, 2005).

A frequência relativa de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço de camundongos vacinados foi similar à verificada nos camundongos controles. No entanto, após infecção com *R. equi* virulento, a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ obtida a partir do baço de animais vacinados foi significativamente maior, em comparação aos controles. Como *R. equi* é um patógeno que apresenta natureza intracelular facultativa, os mecanismos de imunidade mediada por células são cruciais na resistência contra essa bactéria (Kanaly *et al.*, 1996; Hines *et al.*, 1997; Hondalus, 1997). Entretanto, existem controvérsias quanto ao papel das subpopulações de linfócitos na imunidade contra *R. equi*.

Trabalhos prévios, em camundongos e em cavalos, mostraram que tanto linfócitos T CD4⁺ como T CD8⁺ exercem importantes papéis na eliminação de *R. equi* (Nordmann *et al.*, 1992; Hines *et al.*, 2001 e 2003). Hines *et al.* (1997) verificaram que linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ poderiam ser responsáveis pelo *clearance* bacteriano no pulmão de camundongos. Contudo,

células T CD4⁺ sozinhas já seriam suficientes para exercer tal efeito, sendo IFN- γ o mediador primário.

Além de promoverem a ativação de macrófagos via IFN- γ , células T CD4⁺ também ativam linfócitos B, que passam a secretar anticorpos opsonizantes de alta afinidade. A análise do perfil das populações de células B (CD19⁺) e T (CD3⁺), presentes no baço de camundongos vacinados e desafiados, demonstrou que a porcentagem de ambos tipos celulares foi significativamente superior em relação ao número de células provenientes de animais controles. O aumento do número de linfócitos T e B sugere que a resposta imune protetora, desenvolvida contra a rodococose experimental, seja desencadeada por ação conjunta de mecanismos da imunidade mediada por células associados à atividade opsonizante e de fixação de complemento dos anticorpos antígeno-específicos.

Experimentos de transferência passiva têm fornecido evidências de que os anticorpos podem exercer papéis importantes na prevenção do desenvolvimento de pneumonia causada por *R. equi* (Giguère *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 1991; Martens *et al.*, 1989). Estudos realizados por Hietala & Ardands (1987) demonstraram que a opsonização de *R. equi*, com anticorpos específicos, eleva os níveis de fusão do fagossomo ao lisossomo, aumentando significativamente a morte de *R. equi* por macrófagos alveolares.

Como já referido, as alterações histológicas leves verificadas nos órgãos dos camundongos vacinados (Oliveira *et al.*, 2007) associam-se a produção menor de TNF- α e maior de IL-10 nos órgãos desses animais, em relação aos controles. Como IL-10 é uma citocina supressora (Moore *et al.*, 1993) e sua função está diretamente relacionada aos mecanismos de ação das células T reguladoras (Li & Flavell, 2008), foi feita a suposição de que esse tipo celular pudesse participar do controle da intensidade de resposta, observada nos tecidos dos animais vacinados.

Células T reguladoras reduzem a magnitude e duração das respostas induzidas por algumas vacinas (Toka *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2005). Entretanto, essa atuação não implica forçosamente em prejuízo para o hospedeiro; ao contrário, ela pode limitar a destruição tecidual causada por respostas imunes antimicrobianas exacerbadas.

A análise por citometria de fluxo revelou um número significativamente maior de células T CD4⁺CD25⁺ no tecido esplênico de camundongos vacinados, em relação aos controles, que persistiu após o desafio com *R. equi*. Sabe-se que células T CD4⁺ convencionais (CD4⁺CD25⁻) podem passar a expressar o marcador CD25 após sofrerem ativação (Sakaguchi *et al.*, 2000; Shevach *et al.*, 2002; Brusko & Bluestone, 2008). No entanto, essa mesma população celular pode se diferenciar em células T reguladoras, após exposição ao antígeno na presença de sinais específicos, como os proporcionados por IL-10 e TGF- β (O'Garra & Vieira, 2004). Dessa maneira, uma caracterização fenotípica mais completa das células T CD4⁺CD25⁺ é necessária para caracterizá-las como T reguladoras.

O fator de transcrição Foxp3 corresponde a um importante marcador descrito das células T reguladoras, que exerce papel chave no desenvolvimento e função desse tipo celular (Hori *et al.*, 2003; Sakaguchi *et al.*, 2008; Roncarolo & Gregore, 2008). A detecção de TGF- β é considerada de fundamental importância no estudo de células T reguladoras, pois essa citocina exerce função supressora que é crítica para o controle de respostas imunitárias (Gorelik & Flavell, 2002; Kulkarni *et al.*, 1993).

A expressão relativa de Foxp3 e de TGF- β em células esplênicas de camundongos vacinados foi similar à verificada nos camundongos controles. Dessa maneira, ficou evidenciado que o aumento do número de células T CD4⁺CD25⁺ no tecido esplênico de camundongos vacinados não se associa ao aumento de mensagem para Foxp3 e TGF- β . Assim, é válido inferir que as células T CD4⁺CD25⁺ detectadas não correspondam a células T reguladoras, mas sim a

células T ativadas em decorrência do processo de imunização. Em contrapartida, a detecção de mensagem para Foxp3 e TGF- β em células esplênicas de camundongos vacinados e desafiados com *R. equi* foi significativamente maior do que a verificada nos animais dos grupos controles, sugerindo que, após desafio, as células T CD4⁺CD25⁺ detectadas possam corresponder a células T reguladoras.

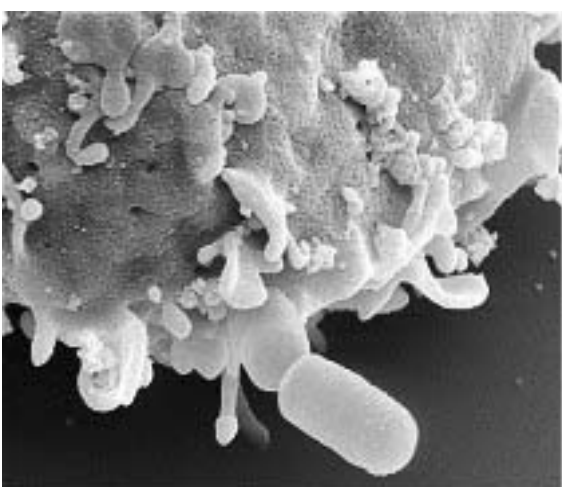
A importância da sinalização promovida por TGF- β é demonstrada pelo fato de que na ausência dessa citocina células T são ativadas, proliferam excessivamente e se diferenciam em células T efectoras. Há migração dessas células para vários órgãos vitais, o que culmina no desenvolvimento de severas imunopatologias (Li *et al.*, 2006a; Marie *et al.*, 2006). A presença TGF- β , capaz de induzir a expressão de Foxp3, promove a diferenciação de células T CD4⁺ *naives* em células T reguladoras. Além disso, TGF- β é responsável por manter a população de células T reguladoras naturais nos órgãos linfóides periféricos (Li & Flavell, 2008).

Vários autores demonstram que a ação conjunta de células T reguladoras e das citocinas supressoras TGF- β e IL-10 é de fundamental importância para controlar a intensidade das respostas inflamatórias contra diferentes patógenos (Hesse *et al.*, 2004; Kinter *et al.*, 2004; Li & Flavell, 2008), prevenindo danos aos tecidos do próprio hospedeiro. Por tais razões, é essencial avaliar a possível participação desse tipo celular na proteção conferida pela vacina.

Assim, o conjunto de resultados demonstra que os animais vacinados desenvolvem resposta imune humoral, celular e de mucosa protetora, predominantemente de padrão Th1, as quais atuam em conjunto e conferem proteção contra a rodococose experimental. Além disso, a presença de células T CD4⁺CD25⁺, associadas a maior expressão de Foxp3 e TGF- β , a maior produção de IL-10 e menor produção de TNF- α , *in vivo*, seriam responsáveis pela resposta

inflamatória de menor intensidade observada nos órgãos de camundongos vacinados (Oliveira *et al.*, 2007).

CONSTRUCTION

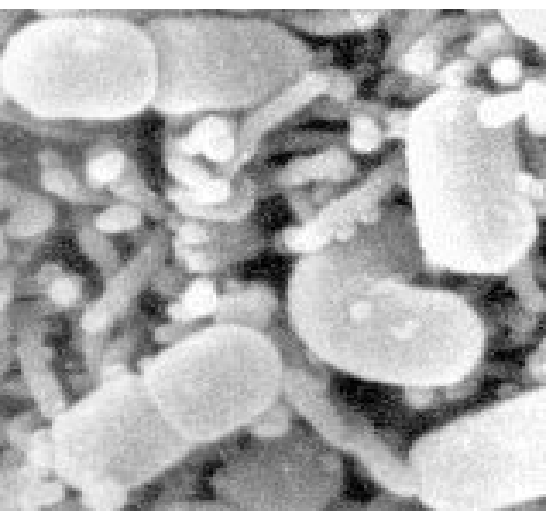


CONCLUSÕES

1. Animais imunizados com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA desenvolveram resposta imune predominantemente de padrão Th1, evidenciada pela alta produção de anticorpos IgG2a, das citocinas IL-12 e IFN- γ e maior expressão do fator de transcrição T-bet;
2. A linhagem vacinal atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA induziu imunidade de mucosa, caracterizada pela produção de IgA antígeno-específica;
3. A vacinação com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 expressando VapA resultou em ativação de macrófagos, evidenciada pela maior produção de óxido nítrico e de peróxido de hidrogênio;
4. Células esplênicas de animais vacinados proliferam frente ao estímulo com APTX;
5. A infecção, com a cepa virulenta de *Rhodococcus equi*, associou-se a um aumento na frequência relativa de células B (CD19⁺), T (CD3⁺), T CD4⁺, T CD8⁺ e no baço dos animais vacinados, em relação aos controles;
6. O desenvolvimento de resposta inflamatória controlada nos órgãos de animais vacinados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (Oliveira *et al.*, 2007) associou-se a maior produção de IL-10 e menor de TNF- α , bem como a ocorrência de número aumentado de células T CD4⁺CD25⁺ e aumento de mensagem para Foxp3 e TGF- β .

**R
E
F
E
R
Ê
N
C
I
A
S

B
I
B
L
I
O
G
R
Á
F
I
C
A
S**



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª Edição. Revinter, RJ, 2003.
- ABUZAKOUK, M.; FEIGHERY, C.; JACKSON, J. Tumor necrosis factor blocking agents: a new therapeutic modality for inflammatory disorders. **Br. J. Biomed. Sci.** v.59, n.3, p.173-9, 2002.
- AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R.I.; LORD, G.M. The role of helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. **Clin. Exp. Immun.** v.148, p.32-46, 2007.
- AINSWORTH, M.D.; YEAGAR, A.E.; EICKER, S.W.; ERB, H.E.; DAVIDOW, E. Athletic performance of horses previously infected with *R. equi* pneumonia as foals. **AAEP Proceedings**. v.43, p.81-2, 1997.
- BACHTIAR, E.W.; SHENG, K.C.; FIFIS, T.; GAMVRELLIS, A.; PLEBANSKI, M.; COLOE, P.J.; SMOOKER, P.M. Delivery of a heterologous antigen by a registered *Salmonella* vaccine (STM1). **FEMS Microbiol. Letters**. v.227, p.211-7, 2003.
- BAO, J.X.; CLEMENTS, J.D. Prior immunologic experience potentiates the subsequent antibody response when *Salmonella* strains are used as vaccine carriers. **Infect. Immun.** v.59, n.10, p.3841-5, 1991.
- BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, C.A.; VALLE, H.A.; GUIMARÃES, C.A.; MOREIRA, V.G. Infecção por *Rhodococcus equi* associada à malacoplaquia em paciente HIV-positivo: relato de caso e revisão da literatura. **Pulmão**. v.14, p.162-9, 2005.
- BASTOS, K.R.B.; MARINHO, C.R.F.; BARBOZA, R.; RUSSO, M.; ALVAREZ, J.M.; LIMA, M.R.D. What kind of message does IL-12 / IL-23 bring to macrophages and dendritic cell? **Microbes Infect.** v.6, p.630-6, 2004.

- BECÚ, T.; POLLEDO, G.; GASKIN, J.M. Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Vet. Microbiol.** v.56, p.193-204, 1997.
- BENOIT, S.; TAOUJI, S.; BENACHOUR, A.; HARTKE, A. Resistance of *Rhodococcus equi* to acid pH. **Int. J. Food Microbiol.** v.55, p.295-8, 2000.
- BENOIT, S.; BENACHOUR, A.; TAOUJI, S.; AUFFRAY, Y.; HARTKE, A. H₂O₂ with causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. **Infect. Immun.** v.70, p.3768-76, 2002.
- BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Curr. Opin. Immun.** v.19, p. 652-7, 2007.
- BEUTLER, B.; TKACENKO, V.; MILSARK, I.; KROCHIN, N.; CERAMI, A. Effect of gamma interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. Reversal of the lpsd (endotoxin resistance) phenotype. **J. Exp. Med.** v.164, n.5, p.1791-6, 1986.
- BOLAND, A.; CORNELIS, G.R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. **Infect. Immun.** v.66, n.5, p.1878-84, 1998.
- BREATHNACH, C.C.; STURGILL-WRIGHT, T.; STILTNER, J.L.; ADAMS, A.A.; LUNN, D.P.; HOROHOV, D.W. Foals are interferon gamma-deficient at birth. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.112, p.199-209, 2006.
- BRUSKO, T.; BLUESTONE, J. Clinical application of regulatory T cells for treatment of type 1 diabetes and transplantation. **J. Immunol.** v.38, p.931-4, 2008.
- CALISTA, D. *Rhodococcus equi* subcutaneous abscess in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.** v.22, n.1, p.129-30, 2008.

- CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J.D. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* ssp as carrier do foreign antigens. **Clin. Microbiol. Ver.** v.5, p.328-42, 1992.
- CÁRDENAS, L.; DASGUPTA, U.; CLEMENTS, J.D. Influence of strain viability and antigen dose on the use of attenuated mutants of *Salmonella* as vaccine carrier. **Vaccine.** v.12, p.833-40, 1994.
- CARTER, P.B.; COLLINS, F.M. The route of enteric infection in normal mice. **J. Exp. Med.** v.139, p.1189-203, 1974.
- CASTON, S.S.; MCCLURE, S.R.; MARTENS, R.J.; CHAFFIN, M.K.; MILES, K.G.; GRIFFITH, R.W.; COHEN, N.D. Effect of hyperimmune plasma on the severity of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in experimentally infected foals. **Vet. Ther.** v.7, n.4, p.361-75, 2006.
- CAUCHARD, J.; SEVIN, C.; BALLEST, J.J.; TAOUJI, S. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. **Vet. Microbiol.** v.30, n.104 (1-2), p.73-81, 2004.
- CHATFIELD, S.N.; CHARLES, I.G.; MAKOFF, A.J.; OXER, M.D.; DOUGAN, G.; PICKARD, D.; SLATER, D.; FAIRWEATHER, N.F. Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. **Bio. Technol.** v.10, p.888-92, 1992.
- CHATFIELD, S.; ROBERTS, M.; LI, J.; STARNES, A.; DOUGAN, G. The use of live attenuated *Salmonella* for oral vaccination. **Dev. Biol. Stand.** v.82, p.35-42, 1994.
- CHEN, M.; CHEN, J.; LIAO, W.; ZHU, S.; YU, J.; LEUNG, W.L.; HU, P.; SUNG, J.J.Y. Immunization with Attenuated *Salmonella* Typhimurium producing catalase in protection against gastric *Helicobacter pylori* infection in mice. **Helicobacter.** v.8, n.6, p.613-25, 2003.

- CHENSUE, W.S.; WARMINGTON, S.K.; RUTH, H.J.; LINCOLN, P.; KUNKEL, L.S. Cytokine function during *Mycobacterial* and *Schistosomal* antigen-induced pulmonary granuloma formation. **J. Immunol.** v.154, p.5969-76, 1995.
- CHIRINO-TREJO, J.M.; PRESCOTT, J.F.; YAGER, J.A. Protection of foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization. **Can. J. Vet. Res.** v.51, p.444-7, 1987.
- CLARCK, M.A.; HIRST, B.H.; JEPSON, M.A. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Ad. Drug Deliv. Rev.** v.43, p.207-23, 2000.
- CLARCK, M.A.; JEPSON, M.A.; HIRST, B.H. Exploiting M cells for drug and vaccine delivery. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** v.50, p.81-106, 2001.
- CONG, H.; GU, Q.M.; JIANG, Y.; HE, S.Y.; ZHOU, H.Y.; YANG, T.T.; LI, Y.; ZHAO, Q.L. Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol.** v.27, n.1-2, p.29-35, 2005.
- CORNISH, N.; WASHINGTON, J. A. *Rhodococcus equi* infections: clinical features and laboratory diagnosis. **Curr. Clin. Top. Infect. Dis.** v.19, p.198-215, 1999.
- COVONE, M.G.; BROCCHI, M.; PALLA, E.; SILVEIRA, W.D.; RAPPUOLI, R.; GALEOTTI, C.L. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.** v.66, p.224-31, 1998.
- CRISCIONE, L.G.; ST CLAIR, E.W. Tumor necrosis factor-alpha antagonists for the treatment of rheumatic diseases. **Curr. Opin. Rheumatol.** v.14, n.3, p.204-11, 2002.
- CRONIN, S.M.; ABIDI, M.H.; SHEARER, C.J.; CHANDRASEKAR, P.H.; IBRAHIM, R.B. *Rhodococcus equi* lung infection in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipient. **Transpl. Infect. Dis.** v.10, n.1, p.48-51, 2008.

- DARJI, A.; GUZMAN, C.A.; GERSTEL, B.; WACHHOLZ, P.; TIMMIS, K.N.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, T.; WEISS S. Oral somatic transgenic vaccination using attenuated *S. typhimurium*. **Cell**. v.91, p.765-75, 1997.
- DARRAH, P.A.; HONDALUS, M.K.; CHEN, Q.; ISCHIROPOULOS, H.; MOSSER, D.M. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. **Infect. Immun.** v.68, n.6, p.3587-93, 2000.
- DARRAH, P.A.; MONACO, M.C.; JAIN, S.; HONDALUS, M.K.; GOLENBOCK, D.T.; MOSSER, D.M. Innate Immune Responses to *Rhodococcus equi*. **J. Immunol.** v.173, n.3, p.1914-24, 2004.
- DECKEN, K.; KOHLER, G.; PALMER-LEHMANN, K.; WUNDERLIN, A.; MATTNER, F.; MAGRAM, J.; GATELY, M.K.; ALBER, G. Interleukin-12 is essential for a protective response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** v.66, n.10, p.4994-5000, 1998.
- DENIS, M.; GHADIRIAN, E. Interleukin-1 is involved in mouse resistance to *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.** v.62, p.457-61, 1994.
- DOIG, C.; GILL, M.; CHURCH, D. *Rhodococcus equi* - an easily missed opportunistic pathogen. **Scand. J. Infect. Dis.** v.23, p.1-6, 1991.
- DONG, C.; FLAVELL, R.A. Control of T helper cell differentiation – in search of master genes. **Science's stke**. v.49, p.1-5, 2000.
- DOUGAN, G.; HORMAECHE, C.E.; MASKELL, D.J. Live oral *Salmonella* vaccines: potential use of attenuated strains as carriers of heterologous antigens to the immune system. **Parasite Immunol.** v.9, p.151-60, 1987.

- DU, A.; WANG, S. Efficacy of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella* Typhimurium against *Eimeria tenella* infection in chickens. **Int. J. Parasitol.** v.35, n.7, p.777-85, 2005.
- ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes Infect.** v.3, p.1191-200, 2001.
- ELLENBERGER, M.; KAERBELE, M.; ROTH, J. Equine humoral immune response to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*. **Am. J. Vet. Res.** v.45, p.2428-30, 1984.
- FERNANDEZ, S.A.; PRESCOTT, F.J.; NICHOLSON, M.V. Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA)-enriched antigens. **Vet. Microbiol.** v.56, p.187-92, 1997.
- FIERER, J.; GUINEY, D.G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. **J. Clin. Invest.** v.107, n.7, p.775-80, 2001.
- FINKELMAN, F.D.; KATONA, I.M.; MOSMANN, T.; COFFMAN, R.L. IFN- γ regulates the isotype of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. **J. Immunol.** v.140, p.1022-7, 1988.
- FLYNN, J.L.; GOLDSTEIN, M.M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C.J.; SCHREIBER, R.; MAK, T.W.; BLOOM, B.R. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity.** v.2, n.6, p.561-72, 1995.
- FONTANALS, A.M.; BECÚ, T.; POLLEDO, G.; GASKIN, C.K.M.; BRAUN, M. Antigenic analysis of *Rhodococcus equi* preparations using different horse sera. **Vet. Microbiol.** v.1369, p.1-9, 1997.

- GALÁN, J.E.; NAKAYAMA, K.; CURTISS III, R. Cloning and characterization of the *asd* gene of *S. typhimurium*: Use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. **Gene**. v.94, p.29-35, 1990.
- GARMORY, H.S.; BROWN, K.A.; TITBALL, R.W. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. **FEMS Microbiol. Rev.** v.26, p.339-53, 2002.
- GARTHWAITE, E.A.; BORDER, D.J.; JONES, C.H.; WORTH, D.P. *Rhodococcus equi* infection during treatment of a c-ANCA positive vasculitis: a case report. **Rheumatol Int.** v.27, n.3, p.285-7, 2007.
- GARTON, N.J.; GILLERON, M.; BRANDO, T.; DAN, H.H.; GIGUERE, S.; PUZO, G.; PRESCOTT, J.F.; SUTCLIFFE, I.C. A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production, **J. Biol. Chem.** v.227, p.31722-33, 2002.
- GEBERT, A. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. **Histochem. Cell Biol.** v.108, p.455-70, 1997.
- GIGUERE, S.; PRESCOTT, J.F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. **Vet. Microbiol.** v.56, p.313-34, 1997.
- GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F. Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*. **Infect. Immun.** v.66, n.5, p.1848-54, 1998.
- GIGUERE, S.; WILKIE, B.N.; PRESCOTT, J.F. Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. **Infect. Immun.**, v.67, n.10, p.5041-7, 1999 (a).
- GIGUERE, S.; HONDALUS, M.K.; YAGER, J.A.; DARRAH, P.; MOSSER, M.D.; PRESCOTT, F.J. Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in

- intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. **Infect. Immun.**, v.67, n.7, p.3548-57, 1999 (b).
- GIGUERE, S.; GASKIN, J.M.; BOWMAN, J.L. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.220, p.59-63, 2002.
- GORELIK, L.; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor-beta in T cell biology. **Nat. Rev. Immunol.** v.2, p.46-53, 2002.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrite, nitrate and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.** v.126, p.131-8, 1982.
- GUILLOBEL, H.C.R.; CARINHANHA, J.I.; CARDENAS, L.; CLEMENTS, J.D.; DE ALMEIDA, D.F.; FERREIRA, L.C. Adjuvant activity of a nontoxic mutant of *Escherichia coli* heat-able enterotoxin on systemic and mucosal immune responses elicited against a heterologous antigen carried by a live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain. **Infect. Immun.** v.68, n.7, p.4349-53, 2000.
- HACKETT, J. Use of *Salmonella* for heterologous gene expression and vaccine delivery system. **Curr. Opin. Biotech.** v.4, p.611-45, 1993.
- HAGHIGHI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Assessment in mice of *vapA*-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. **Vet. Immun. Immunopath.** v.104, p.215-25, 2005.
- HANSCH, R.C.H.; SMITH, A.D.; MIELKE, A.E.M.; HAHN, H.; BANCROFT, J.G.; EHLERS, S. Mechanisms of granuloma formation in murine *Mycobacterium avium* infection: the contribution of CD4+ T cells. **Internat. Immun.** v.8, p.1299-310, 1996.

- HESSE, M.; PICCIRILLO, C.A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A.W.; SHEVACH, E.M.; WYNN, T.A. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J. Immunol.** v.172, p.3157-66, 2004.
- HIETALA, S.K.; ARDANS, A.A. Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi*-exposed and non-exposed foals. **Vet. Microbiol.** v.14, n.3, p.307-20, 1987.
- HIGUCHI, T.; TAHARAGUCHI, S.; HASHIKURA, S.; HAGIWARA, S.; GOJO, C.; SATOH, S.; YOSHIDA, M.; TAKAI, S. Physical and serologic examinations of foals at 30 and 45 days of age for early diagnosis of *Rhodococcus equi* infection on endemically infected farms. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.212, p.976-81, 1998.
- HINES, S.A.; KANALY, S.T.; BYRNE, B.A.; PALMER, G.H. Immunity to *Rhodococcus equi*. **Vet. Microbiol.** v.56, p.177-85, 1997.
- HINES, T.M.; PAASCH, M.K.; ALPERIN, C.D.; PALMER, H.G.; WESTHOFF, C.N.; HINES, A.S. Immunity to *Rhodococcus equi*: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.79, p.101-13, 2001.
- HINES, S.A.; STONE, D.M.; HINES, M.T.; ALPERIN, D.C.; KNOWLES, D.P.; NORTON, L.K.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W.C.; MCGUIRE, T.C. Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.10, n.2, p.208-15, 2003.
- HOBSON, P.; BARNFIELD, C.; BARNES, A.; KLAVINSKIS, L.S. Mucosal immunization with DNA vaccines. **Methods.** v.31, n.3, p.217-24, 2003.
- HOISETH, S.K.; STOCKER, B.A.D. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccine. **Nature.** v.291, n.5812, p.238-9, 1981.

- HONDALUS, M.K.; DIAMOND, S.M.; ROSENTHAL, A.L.; SPRINGER, A.T.; MOSSER, D.M. The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-1 to bind to mammalian cells. **Infect. Immun.**, v.61, p.2919-29, 1993.
- HONDALUS, M.K.; MOSSER, D.M. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. **Infect. Immun.** v.62, p.4167-75, 1994.
- HONDALUS, M.K. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. **Vet. Microbiol.** v.56, p.257-68, 1997.
- HOOPER, M.; GIGUERE, S.; WILKIE, B.N.; PRESCOTT, J.F. Evaluation of equine immunoglobulin specific for *R. equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia. **Am. J. Vet. Res.** v.62, p.1307-13, 2001.
- HOPKINS, S.; KRAEHENBUHL, J.P.; SCHODEL, F.; POTTS, A.; PETERSON, D.; DE GRANDI, P.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. A recombinant *Salmonella* Typhimurium vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. **Infect. Immun.** v.63, n.9, p.3279-86, 1995.
- HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.** v.299, p.1057-61, 2003.
- HORMAECHE, C.E. Live attenuated *Salmonella* vaccines and their potential as oral combined vaccines carrying heterologous antigens. **J Immunol Methods.** v.142, n.1, p.113-20, 1991.
- HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, M.S. Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus* mutants under control of the anaerobically inducible nirB promoter. **Infect. Immun.** v.68, n.3, p.1549-56, 2000.

- HUBBARD, R.D.; FLORY, C.M.; COLLINS, F.M.; COCITO, C. Immunization of mice with the antigen A60 of *Mycobacterium bovis* BCG. **Clin Exp Immunol.** v.88, n.1, p.129-131, 1992.
- JACKS, S.; GIGUÈRE, S.; CRAWFORD, P.C.; CASTLEMAN, W.L. Experimental infection of neonatal foals with *Rhodococcus equi* triggers adult-like gamma interferon induction. **Clin. Vac. Immunol.** v.14, n.6, p.669-77, 2007.
- JACKS, S.; GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F. In vivo expression of and cell-mediated immune responses to the plasmid-encoded virulence-associated proteins of *Rhodococcus equi* in foals. **Clin. Vac. Immunol.** v.14, n.4, p.369-74, 2007 (b).
- JAIN, V.; MEKALANOS, J. Use of lambda phage S and R gene products in an inducible lysis system for *Vibrio cholerae* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-based DNA vaccine delivery systems. **Infect. Immun.** v.68, n.2, p.986-9, 2000.
- JAIN, S.; BLOOM, B.R.; HONDALUS, M.K. Deletion of *vapA* encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete *R. equi*. **Mol. Microbiol.** v.50, p.115-28, 2003.
- JANKOVIC, D.; KULLBERG, M.C.; FENG, C.G.; GOLDSZMID, R.S.; COLLAZO, C.M.; WILSON, M.; WYNN, T.A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R.A.; SHER, A. Conventional Tbet(+) Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **J. Exp. Med.** v. 204, p. 273-83, 2007.
- JEPSON, M.A.; CLARCK M.A. The role of M cells in *Salmonella* infection. **Microbes Infect.** v.3, p.1183-90, 2001.
- JOHNSON, J.; PRESCOTT, J.; MARKHAM, R. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intrabronchial challenge. **Vet. Pathol.** v.20, p.440-9, 1983.

- JONES, B.D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *S. typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying epithelial M cells of the Peyer's patches. **J. Exp. Med.** v.180, p.15-23, 1994.
- KALUPAHAMA, R.S.; MASTROENI, P.; MASKELL, D.; BLACKLAWS, B.A. Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Immunology.** v.115, p.462-72, 2005.
- KANALY, S.T.; HINES, S.A.; PALMER, G.H. Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4⁺ T-lymphocyte-Deficient transgenic mice. **Infect. Immun.** v.61, p.4929-32, 1993.
- KANALY, S.T.; HINES, S.A.; PALMER, G.H. Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. **Infect. Immun.** v.63, n.8, p.3037-41, 1995.
- KANALY, S.T.; HINES, S.A.; PALMER, G.H. Transfer of a CD4⁺ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. **Infect. Immun.** v.64, p.1126-32, 1996.
- KASUGA-AOKI, H.; TAKAI, S.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; MADARAME, H.; NAKANES, A. Tumor necrosis factor and interferon- γ are required in host resistance against virulent *Rhodococcus equi* infection in mice: cytokine production depends on the virulence levels of *R. equi*. **Immunol.** v.96, p.122-7, 1999.
- KAUFFMANN, S.H.E.; RAUPACH, B.; FINLAY, B.B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes Infect.** v.3, p.1177-81, 2001.
- KAWABATA, K.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. **Pharm. Res.** v.12, p.825-30, 1995.

- KEDLAYA, I.; ING, M.B.; WONG, S.S. *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. **Clin. Infect. Dis.** v.32, p.39-46, 2001.
- KINTER, A.L.; HENNESSEY, M.; BELL, A.; KERN, S.; LIN, Y.; DAUCHER, M.; PLANTA, M.; MCGLAUGHLIN, M.; JACKSON, R.; ZIEGLER, S.F.; FAUCI, A.S. CD25(+) CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. **J. Exp. Med.** v.200, p.331-43, 2004.
- KOTTON, C.N.; HOHMANN, E.L. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. **Infect. Immun.** v.72, p.5535-47, 2004.
- KRAEHENBUHL, J.P.; NEUTRA, M.R. Epithelial M cells: differentiation and function. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** v.16, p.301-32, 2000.
- KULKARNI, A.B.; HUH, C.G.; BECKER, D.; GEISER, A.; LYGH, M.; FLANDERS, K.C.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; WARD, J.M.; KARLSSON, S. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. **PNAS.** v.90, p.770-4, 1993.
- LALMANACH, A.C.; LANTIER, F. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. **Microbes Infect.** v.1, p.719-26, 1999.
- LANGE, U.G.; MASTROENI, P.; BLACKWELL, J.M.; STOBBER, C.B. DNA-*Salmonella enterica* serovar Typhimurium primer-booster vaccination biases towards T helper 1 responses and enhances protection against *Leishmania major* infection in mice. **Infect. Immun.** v.72, p.4924-8, 2004.
- LANGERMANS, J.A.M.; VAN FURTH R. Cytokines and the host defense against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. **Biotherapy.** v.7, p.169-78, 1994.

- LEE, H.J.; TAKEMOTO, N.; KURATA, H.; KAMOGAWA, Y.; MIYATAKE, S.; O'GARRA, A.; ARAI, N. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokines expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. **JEM.** v.192, p.105-15, 2000.
- LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; CLEMENTS, M.L. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiol. Rev.** v.47, p.510-50, 1983.
- LEW, D.; PARKER, S.; LATIMER, T.; ABAI, A.; KUWAHARA-RUNDELL, A.; DOH, S.; YANG, Z-Y.; GROMKOWSKI, S.; NABEL, G.; MANTHROPE, M.; NORMAN, J. Cancer gene therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. **Hum. Gene Ther.** v.6, p.553-64, 1995.
- LI, M.O.; SANJABI, S.; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and independent mechanisms. **Immunity.** v. 25, p. 455-471, 2006.
- LI, M.O.; FLAVELL, R.A. Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Growth Factor- β and Interleukin-10. **Immunity.** v.28, p. 468-475, 2008.
- LOPEZ, A.M.; HINES, M.T.; PALMER, G.H.; ALPERIN, D.C.; HINES, S.A. Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.9, n.6, p.1270-6, 2002.
- LOPEZ, A.M.; HINES, M.T.; PALMER, G.H.; KNOWLES, D.P.; ALPERIN, D.C.; HINES, S.A. Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the *vapA* of *Rhodococcus equi*. **Vaccine.** v.21, p.3815-25, 2003.
- LOPEZ, A.M.; TOWNSEND, H.G.G.; ALLEN, A.L.; HONDALUS, M.K. Safety and immunogenicity of a live-attenuated auxotrophic candidate vaccine against the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. **Vaccine.** v.26, p.998-1009, 2008.

- MADARAME, H.; TAKAI, S.; MORISAWA, N.; FUJII, M.; HIDAKA, D.; TSUBAKI, S.; HASEGAWA, Y. Immunohistochemical detection of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* in pulmonary lesions of foals. **Vet. Pathol.** v.33, p.341-3, 1996.
- MADIGAN, E.J.; HIETALA, S.; MULLER, S.N. Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v.44, p.571-8, 1991.
- MAGNUSSON, H. Spezifische infektiöse pneumonie beim Fohlen. Ein neuer eiterreger beim Pferd. **Arch. Wiss. Prakt. Tierhelkd.** v.50, p.22-38, 1923.
- MARIE, J.C.; LIGGITT, D.; RUDENSKY, A.Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. **Immunity.** v.25, p.441-54, 2006.
- MARTENS, R.J.; MARTENS, J.G.; FISKE, R.A.; HIETALA, S.K. *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. **Equine Vet. J.** v.21, p.249-55, 1989.
- MARTENS, R.J.; COHEN, N.D.; JONES, S.L.; MOORE, T.A.; EDWARDS, J.F. Protective role of neutrophils in mice experimentally infected with *Rhodococcus equi*. **Infect. Immun.** v.73, n.10, p.7040-2, 2005.
- MASTROENI, P.; VAZQUEZ-TORRES, A.; FANG, F.C.; XU, Y.; KHAN, S.; HORMAECHE, C.E.; DOUGAN, G. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. **J. Exp. Med.** v.192, p.237-48, 2000.
- MATSIOTA-BERNARD, P.; LAIR, I.; VOGIATZAKIS, E.; BERNEMANN, A. T-cell response during *Rhodococcus equi* infection in a murine experimental model. **Res. Immunol.** v.148, n.6, p.387-97, 1997.

- MEALEY, R.H.; STONE, D.M.; HINES, M.T.; ALPERIN, D.C.; LITTKE, M.H.; LEIB, S.R.; LEACH, S.E.; HINE, S.A. Experimental *Rhodococcus equi* and equine infectious anemia virus DNA vaccination in adult and neonatal horses: Effect of IL-12, dose, and route. **Vaccine**. v.25, p.7582–97, 2007.
- MEDINA, E.; PAGLIA, P.; NIKOLAUS, T.; MULLER, A.; HENSEL, M.; GUZMAN, C.A. Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. **Infect. Immun.** v.67, n.3, p.1093-99, 1999.
- MEIJER, W.G.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. **Vet. Res.** v.35, p.383-96, 2004.
- MIELCAREK, N.; ALONSO, S.; LOCHT, C. Nasal vaccination using live bacterial vectors. **Adv. Drug. Del. Rev.** v.51, p.55-69, 2001.
- MITSUYAMA, M.; IGARASHI, K.I.; KAWAMURA, I.; OHMORI, T.; NOMOTO, K. Difference in the induction of macrophage interleukin-1 production between viable and killed cells of *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.** v.58, p.1254-60, 1990.
- MOLLENKOPF, H.J.; TRIEBKORN, D.G.; ANDERSEN, P.; HESS, J.; KAUFMANN, S.H.E. Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella typhimurium* vaccine carrier strain and expressed by naked DNA. **Vaccine**. v.19, p.4028-35, 2001.
- MONACK, D.M.; NAVARRE, W.W.; FALKOW, S. *Salmonella*-induced macrophage death. **Micobes Infect.** v.3, p.1201-12, 2001.
- MOORE, K.W.; O'GARRA, A.; DE WAAL, M.R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R. Interleukin-10. **Annu. Ver. Immunol.** v.11, p.165-90, 1993.

- MOORE, A.C.; GALLIMORE, A.; DRAPER, S.J.; WATKINS, K.R.; GILBERT, S.C.; HILL, A.V. Anti CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodominance. **J. Immunol.** v.175, p.7264-73, 2005.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.** v.136, n.7, p.2348-57, 1986.
- MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv. Immunol.** v.46, p.111-47, 1989.
- MULLER, S.N.; MADIGAN, E.J. Methods of implementation of an immunoprophylaxis program for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia: results of 5 years study. In: **Proc. 38th Ann. Con. Am. Assoc. Equine Pract.** v.38, p.193-201, 1992.
- NARDELLI-HAEFLIGER, D.; BENYACOUB, J.; LEMOINE, R.; HOPKINS-DONALDSON, S.; POTTS, A.; HARTMAN, F.; KRAEHENBUHL, J.P.; DE GRANDI, P. Nasal vaccination with attenuated *Salmonella typhimurium* strains expressing the hepatitis B nucleocapsid: dose response analysis. **Vaccine.** v.19, p.2854-61, 2001.
- NEWTON, S.M.C.; KLEBBA, P.E.; HOFNUNG, M. Studies of the anaerobically induced promoter *pnirB* and the improved expression of bacterial antigens. **Res.Microbiol.** v.146, p.193-202, 1995.
- NORDMANN, P.; RONCO, E.; NAUCIEL, C. Role of T-lymphocyte subsets in *Rhodococcus equi* infection. **Infect. Immun.** v.60, p.2748-52, 1992.
- NORDMANN, P.; RONCO, E.; GENOUNOU, M. Involvement of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in host defense against *Rhodococcus equi*. **J. Infect. Dis.** v.167, p.1456, 1993.

- OBÓN, A.B.; GUTIÉRREZ, C.I.; VILLANUEVA, A.B.; MARTÍN, V.L.; MONTOIRO A.R. Cerebral abscess by *Rhodococcus equi* in a HIV-negative patient. **An. Med. Intern.** v.24, n.2, p.75-6, 2007.
- O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat. Med.** v.10, p.801-5, 2004.
- OLIVEIRA, A.F.; FERRAZ, L.C.; BROCCHI, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. **Microbes Infect.** v.9, p.382-90, 2007.
- OUYANG, W.; RANGANATH, S.H.; WEINDEL, K.; BHATTACHARYA, D.; MURPHY, T.L.; SHA, W.C.; MURPHY, K.M. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. **Immunity.** v.9, p.745-55, 1998.
- PACELLI, R.; WINK, D.A.; COOK, J.A.; KRISHNA, M.C.; DE-GRAFF, W.; FRIEDMAN, N.; TSOKOS, M.; SAMUNI, A.; MITCHELL, J.B. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. **J. Exp. Med.** v.182, p.1469-79, 1995.
- PAGLIA, P.; MEDINA, E.; ARIOLI, I.; GUZMAN, C.A.; COLOMBO, M.P. Gene transfer in dendritic cells, induce by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. **Blood.** v.92, p.3172-6, 1998.
- PASCUAL, D.W.; POWELL, R.J.; LEWIS, G.K.; HONE, D.M. Oral bacterial vaccine vectors for the delivery of subunit and nucleic acid vaccines to the organized lymphoid tissue of the intestine. **Behring-Inst.-Mitt.** v.98, p.143-52, 1997.
- PEI, Y.; NICHOLSON, V.; WOODS, K.; PRESCOTT, J.F. Immunization by intrabronchial administration to 1-week-old foals of an unmarked double gene disruption strain of *Rhodococcus equi* strain 103+. **Veter. Microbiol.** v.125, p.100-10, 2007.

- PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods.** v.46, n.2, p.211-26, 1981.
- PIETILÄ, T.E.; VECKMAN, V.; KYLLÖNEN, P.; LÄHTEENMÄKI, K.; KORHONEN, T.K.; JULKUNEN, I. Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in *Salmonella*-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. **J. Leukoc. Biol.** v.78, n.4, p.909-20, 2005.
- PRESCOTT, J.F.; MARKHAM, R.J.F.; JOHNSON, J.A. Cellular and humoral immune response of foals to vaccination with *Corynebacterium equi*. **Can. J. Comp. Med.** v.43, p.356-64, 1979.
- PRESCOTT, F.J.; PATTERSON, C.M.; NICHOLSON, M.V.; MOREIN, B.; YAGER, A.J. Assessment of the immunogenic potential of *Rhodococcus equi* virulence associated protein (VapA) in mice. **Vet. Microbiol.** v.56, p.213-25, 1997.
- RIBEIRO, M.G.; SEKI, I.; YAKSUOKA, K.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Disease.** v.28, p.53-61, 2005.
- RONCAROLO, M.G.; GREGORI, S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M.K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. Rev.** v.212, p.28-50, 2006.
- RONCAROLO, M.G.; GREGORI, S. The validity of Foxp3 to define human and mouse regulatory T cells. **J Immunol.** v.38, p.925-7, 2008.
- ROZSYPAL, H.; ASTER, V.; STAHIKOVÁ, M.; HOROVÁ, B. *Rhodococcus equi* infection in subjects infected with human immunodeficiency virus (HIV). **Cas. Lek. Cesk.** v.146, n.2, p.163-7, 2007.

- SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**. v.101, p.455-8, 2000.
- SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in the past and for the future. **J. Immunol**. v.38, p.901-3, 2008.
- SARMENTO, A.; APPELBERG, R. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in in vitro-cultured mouse macrophages. **Infect. Immun**. v.63, p.3759-64, 1995.
- SCHEVACH, E.M. CD4+ CD5+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol**. v.2, p. 389-400, 2002.
- SCHUTT, C. Fighting infection: the role of lipopolysaccharide binding proteins CD14 and LBP. **Pathobiology**. v.67, p.227-9, 1999.
- SHATA, M.T.; STEVCEVA, L.; AGWALE, S.; LEWIS, G.K.; HONE, D.M. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. **Mol. Med. Today**. v.6, n.2, p.66-71, 2000.
- SHIAU, A.L.; CHEN, C.C.; YO Y.T.; CHU, C.Y.; WANG, S.Y.; WU, C.L. Enhancement of humoral and cellular immune responses by an oral *Salmonella choleraesuis* vaccine expressing porcine prothymosin alpha. **Vaccine**. v.23 (48-49), p.5563-71, 2005.
- SIRARD, J.C.; NIEDERGANG, F.; KRAEHENBUHL, J.P. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. **Immunol. Rev**. v.171, p.5-26, 1999.
- SIZEMORE, D.R.; BRANSTROM, A.A.; SADOFF, J.C. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. **Science**. v.270, p.299-302, 1995.
- SIZEMORE, D.R.; BRANSTROM, A.A.; SADOFF, J.C. Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. **Vaccine**. v.15, p.804-7, 1997.

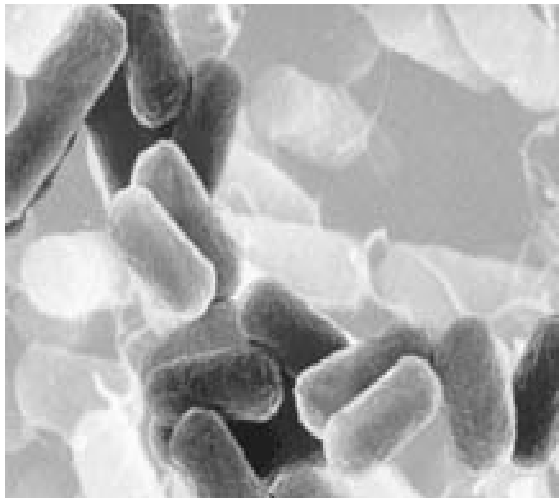
- SNAPPER, C.M.; FINKELMAN, F.D. In: PAUL, W.E. (Ed.), **Fundamental Immunology**, third ed. Raven Press, New York, p.845-46, 1993.
- SPEERT, D.P. Macrophages in bacterial infection. In: LEWIS C.E., MCGEE J.O. **The Macrophage**. **Oxford: Oxford University Press**. p.215-63, 1992.
- STAATS, H.F.; JACKSON, R.J.; MARINARO, M.; TAKAHASHI, I.; KIYONO, H.; MCGHEE, J.R. Mucosal immunity to infection with implication for vaccine development. **Curr. Opin. Immunol.** v.6, p.572-83, 1994.
- TAKAI, S.; WATANABE, Y.; IKEDA, T.; OZAWA, T.; MATSUKURA, S.; TAMADA, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. **J. Clin. Microbiol.** v.31, p.1726-9, 1993.
- TAKAI, S.; SASAKI, Y.; IKEDA, T.; UCHIDA, Y.; TSUBAKI, S. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. **J. Clin. Microbiol.** v.32, p.457-60, 1994.
- TAKAI, S.; MADAREME, H.; MATSUMOTO, C.; INOUE, M.; SASAKI, Y.; HASEGAWA, Y.; TSUBAKI, S.; NAKANE, A. Pathogenesis of *Rhodococcus equi* infection in mice: roles of virulence plasmids and granulogenic activity of bacteria. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.11, p.181-90, 1995.
- TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; KAMISAWA, K.; IMAI, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperatura and pH. **Microbiol. Immunol.** v.40, p.591-4, 1996.
- TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. **Vet. Microbiol.** v.56, p.167-76, 1997.

- TAKAI, S.; TAKEDA, K.; NAKANO, Y.; KARASAWA, T.; FURUGOORI, J.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; HIGUCHI, T.; ANZAI, T.; WADA, R. KAMADA, M. Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* in an infected foal. **J. Clin. Microbiol.** v.35, n.7, p.1904-8, 1997.
- TAKAI, S.; KOBAYASHI, C.; MURAKAMI, K.; YUKAKO, S.; TSUBAKI, S. Live virulent *Rhodococcus equi*, rather than killed or avirulent, elicits protective immunity to *R. equi* infection in mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.24, p.1-9, 1999.
- TAKAI, S.; ANZAI, T.; FUJITA, Y.; AKITA, O.; SHODA, M.; TSUBAKI, S.; WADA, R. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20 kDa protein (VapB) in foals. **Vet. Microbiol.** v.76, p.71-80, 2000.
- TAN, C.; PRESCOTT, F.J.; PATTERSON, C.M.; NICHOLSON, M.V. Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. **Can. J. Vet. Res.** v.59, p.51-9, 1995.
- TAOUJI, S.; NOMURA, I.; GIGUERE, S.; TOMOMITSU, S.; KAKUDA, T.; GANNE, V.; TAKAI, S. Immunogenicity of synthetic peptides representing linear B-cell epitopes of VapA of *Rhodococcus equi*. **Vaccine.** v.12, n.22 (9-10), p.1114-23, 2004.
- TOKA, F.N.; SUVAS, S.; ROUSE, B.T. CD4⁺ CD25⁺ T cell regulate vaccine-generated primary and memory CD8⁺ T-cell responses against herpes simplex virus type 1. **J. Virol.** v.78, p.13082-9, 2004.
- TOYOOKA, K.; TAKAI, S.; KIRIKAE, T. *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. **J. Med Microbiol.** v.54, p.1007-15, 2005.
- TORRES-TORTOSA, M.; ARRIZABALAGA, J.; VILLANUEVA, J. L.; GÁLVEZ, J.; LEYES, M.; VALENCIA, E.; FLORES, J.; PEÑA, J. M.; PÉREZ-CECILIA, E.; QUEREDA, C.

- Prognosis and clinical evaluation of infection caused by *Rhodococcus equi* in HIV-infected patients. **Chest**. v.123, p.1970-76, 2003.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Rev. Immunol.** v.3, p.133-45, 2003.
- ULIVIERI, S.; OLIVERI, G. Cerebellar abscess due to *Rhodococcus equi* in an immunocompetent patient: case report and literature review. **J. Neurosurg. Sci.** v.50, n.4, p.127-9, 2006.
- VARGA, J.; FODOR, L.; RUSVAI, M.; SOÓS, I.; MAKRAI, L. Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. **Vet. Microbiol.** v.56, p.205-12, 1997.
- VAZQUEZ-TORRES, A.; FANG, F.C. Oxygen-dependent anti-*Salmonella* activity of macrophages. **Trends Microbiol.** v.9, p.29-33, 2001.
- VÁZQUEZ-TORRES, A.; FANTUZZI, G.; EDWARDS, C.K. III; DINARELLO, C.A.; FANG, F.C. Defective localization of the NADPH phagocyte oxidase to *Salmonella*-containing phagosomes in tumor necrosis factor p55 receptor-deficient macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.98, n.5, p.2561-5, 2001.
- VOTAVA, M.; SKALKA, B.; TEJKALOVA, R. *Rhodococcus equi* - a newly recognized opportunistic pathogen in man. **Epidemiol. Microbiol. Immunol.** v.46, p.58-66, 1997.
- VULLO, V.; MASTROIANNI, C.M.; LICHTNER, M.; MENGONI, F.; D'AGOSTINO, C.; FORCINA, G.; CORPOLONGO, A.; DELIA, S. *Rhodococcus equi* infection of monocytes/macrophages from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and healthy individuals: evaluation of intracellular killing and nitric oxide production. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.21, n.1, p.11-17, 1998.

- WADA, R.; KAMADA, M.; ANZAI, T.; NAKANISHI, A.; KANEMARU, T.; TAKAI, S.; TSUBAKI, S. Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. **Vet. Microbiol.** v.56, p.301-12, 1997.
- WEINSTOCK, DM; BROWN, AE. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. **Clin. Infect. Dis.** v.34, p.1379-85, 2002.
- WHITTLE, B.L.; VERNA, N.K. The immune response to a B-cell epitope delivered by *Salmonella* is enhanced by prior immunological experience. **Vaccine.** v.15, p.1737-40, 1997.
- WILSON, D.W. Foal Pneumonia. In: ROBINSON E.N. **Curr. Ther. Equine Medicine. 4.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company**, p.612-19, 1997.
- WYSZYNSKA, A.; RACZKO, A.; LIS, M.; JAGUSZTYN-KRYNICKA, E.K. Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 cjaA gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. **Vaccine.** v.22, n.11-12, p.1379-89, 2004.
- YAGER, J.A.; PRESCOTT, C.A.; KRAMAR, D.P.; HANNAH, H.; BALSON, G.A.; CROY, B.A. The effect of experimental infection with *Rhodococcus equi* on immunodeficient mice. **Vet. Microbiol.** v.28, p.363-76, 1991.
- YANG, X.L.; LIU, W.C.; YANG, W.W.; ZHONG, D.; LIU, Y.H.; ZHANG, J.D.; JIANG, J.H.; LI, S.S. Oral immunization of mice with vaccine of attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease B subunit. **Biomed. Environ. Sci.** v.18, n.6, p.411-8, 2005.
- YANG, X.; HINNEBUSCH, B.J.; TRUNKLE, T.; BOSIO, C.M.; SUO, Z.; TIGHE, M.; HARMSEN, A.; BECKER, T.; CRIST, K.; WALTERS, N.; AVCI, R.; PASCUAL, D.W. Oral vaccination with *Salmonella* simultaneously expressing *Yersinia pestis* F1 and V antigens protects against bubonic and pneumonic plague. **J. Immunol.** v.178, p.1059-67, 2007.

A N E X O



Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*.

Aline Ferreira Oliveira, Luciana Colbachini Ferraz, Marcelo Brocchi, and Maria-Cristina Roque-Barreira.

Microbes Infect. v.9, p.382-90, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)