



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia

**RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS EM CAPRINOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR  
*CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* SOB EFEITO DE  
HORMÔNIOS DA REPRODUÇÃO**

JOSÉ VASCONCELOS LIMA OLIVEIRA  
Tese de Doutorado

Salvador – Bahia  
2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia

**RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS EM CAPRINOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR  
*CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* SOB EFEITO DOS  
HORMÔNIOS DA REPRODUÇÃO**

Autor: José Vasconcelos Lima Oliveira  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Songelí Menezes Freire  
Co-Orientador: Prof. Roberto Nascimento Meyer

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Bahia  
2006

Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca do ICS / UFBA – Salvador – Bahia

O48 Oliveira, José Vasconcelos Lima,  
Estudos das respostas imunológicas em caprinos  
experimentalmente  
infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* sob efeito dos  
hormônios da reprodução (progesterona, estrógeno e hormônio  
masculino) /. – Salvador, 2006.  
xi, 126 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2006.

Orientador: Profa. Dra. Songelí Menezes Freire.

Co-Orientadora: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.

1. Leucograma. 2. Imunoglobulinas. 3. Interferon gama. 4. Caprinos.  
5. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 6. Imunologia.  
I. Freire, Songelí Menezes. II. Nascimento, Roberto José Meyer.  
III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde.  
IV. Título.

CDU: 615.37

# SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

Lista de tabelas

Lista de figuras

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2.0</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	4
2.1	Aspecto da linfadenite caseosa	4
2.2	Respostas imunológicas a patógenos intracelular	6
<b>3.0</b>	<b>OBJETIVOS</b>	16
3.1	Objetivos gerais	16
3.2	Objetivos específicos	16
<b>4.0</b>	<b>MANUSCRITOS</b>	18
4.1	Manuscrito 1	18

4.2	Manuscrito 2	53
4.3	Manuscrito 3	61
<b>5.0</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	85
<b>6.0</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	92
<b>7.0</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA</b>	95
<b>8.0</b>	<b>ANEXOS</b>	114

## DEDICATÓRIA

Às mulheres da minha vida:

À minha mãe “*in memoriam*” que muitas vezes abandonou o próprio sonho para que os meus se tornassem realidade, obrigado por tanta dedicação, força, incentivo e apoio.

À Dulce, Júlia, Luna, Mila e Nice. Minha família pelo apoio incondicional, carinho e compreensão.

A todos aqueles que me auxiliaram na execução deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À orientadora desta tese, Dr<sup>a</sup> Songeli Menezes Freire, pela incansável demonstração de valores éticos, pela disponibilidade constante de sugerir, comentar e corrigir as diversas etapas deste trabalho; a colega e amiga, mas sobretudo a profissional.

Ao co-orientador Dr. Roberto Meyer colega e amigo de longas datas, pela demonstração de amizade, constante disponibilidade e apoio a este trabalho. Um dos pioneiros do ensino e pesquisa da imunologia na Bahia, cuja competência, ética e seriedade com que trata o serviço público se constitui em estímulo para tantos outros.

Bruno Paule, Lia Fernandes, Lilia Moura Costa, Maria Consuelo C. Ayres, Renato Carminati e Robson Bahia. Vocês são os responsáveis por muito em diversas fases deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
Ag	Antígeno
C	Cobertura
CD-40	Moléculas co-estimulatórias em células apresentadoras de antígeno
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
Ecg	Gonadotrofina sérica equina
EDTA-K3	Etileno diamino tetracetato tripotássico
ELISA	Enzyme linked-immunosorbent assay (Ensaio Enzimático)
Fc $\gamma$ R	Receptores para a porção Fc da IgG
FSH-p	Hormônio folículo estimulante porcino
G	Grupo
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GLM	Modelo geral linear
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
HPG	Hipotálamo-pituitária-gonadal
HRP	Peroxidase
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G



IgG1	Imunoglobulina de classe G1
IgG2	Imunoglobulina de classe G2
IgG3	Imunoglobulina de classe G3
IgG4	Imunoglobulina de classe G4
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL	Interleucinas
IL-1	Interleucina
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-14	Interleucina 14
IL-15	Interleucina 15
IFN- $\gamma$	Interferon gama
INF- $\beta$	Interferon beta
Kd	kilo Dalton
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
M	Mol
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II

MCP-1	“Monocyte chemoattractant protein 1”. (fator quimiotático para monócito).
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
N	Normal
NK	Célula Natural Killer
OPD	Orto-fenileno-diamina
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
P4	Progesterona
PGE	Prostaglandina E
PHA	Fitohemaglutinina
PPD	Derivado protéico purificado de <i>M. tuberculosis</i>
PWM	Pockweed
SNC	Sistema nervoso central
TCD4+	Célula T expressando molécula CD4 na superfície
TCD8+	Célula T expressando molécula CD8 na superfície
T $\gamma\delta$	Linfócito T com receptor heterodimérico $\gamma\delta$
TGF	Fator de transformação do crescimento B
TH1	Célula T “helper” (Auxiliadora) do tipo 1
TH2	Célula T “helper” (Auxiliadora) do tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## RESUMO

Considerando a grande dificuldade em identificar e excluir animais com infecções subclínicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* nos programas de biotecnologia da reprodução, foram analisados aspectos das respostas imune celular e humoral de caprinos infectados experimentalmente com uma cepa selvagem de *C. pseudotuberculosis*. Foram determinados os valores séricos de IgG e IgM total e específico anti- *C. pseudotuberculosis*, contagem total e diferencial dos leucócitos de sangue periférico e os níveis da produção de interferon- $\gamma$  por células de sangue total. Utilizaram-se seis grupos experimentais assim distribuídos: G I – ovariectomizados + *C. pseudotuberculosis*; G II – estrógeno + *C. pseudotuberculosis*; G III – ciclo estral + *C. pseudotuberculosis*; G IV – Progesterona + *C. pseudotuberculosis*; G V – Animais machos + *C. pseudotuberculosis*; G VI – Controle. Os resultados obtidos na utilização do antígeno secretado como revelador da ativação dos componentes humoral e celular na resposta imune do hospedeiro caprino, na comparação das médias dos índices de produção do IFN- $\gamma$  entre as coletas dos diversos grupos experimentais, não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ), como também entre as respostas dos índices do antígeno com mitógeno PWM e com PBS. Observou-se nas fêmeas redução do número total de leucócitos, ficando abaixo da média normal da espécie, e no grupo dos animais masculinos houve um aumento do número total dos leucócitos, comparado com o grupo controle e as médias leucocitárias descritas na literatura. Concluiu-se que as alterações fisiológicas nas fêmeas e nos machos podem ser causadas pelos hormônios utilizados nos respectivos grupos experimentais. Não foi observada influência ( $p > 0,05$ ) sobre os níveis séricos de imunoglobulinas (IgG e IgM) entre os grupos experimentais tratados. Porém, os anticorpos IgG específicos foram bem caracterizados com

diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos infectados experimentalmente e o grupo não infectado (controle).

Palavras-chave: Resposta humoral e celular, Leucograma, Imunoglobulinas, Interferon gama, Caprino.

## ABSTRACT

Considering the great difficulty in identifying and excluding animals that are carriers of subclinical *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in programs of biotechnology of the reproduction, the aspects of the humoral and cellular immune response of goats experimentally infected with a wild strain of *C. pseudotuberculosis* were analysed. The serum serical values of IgG total and specific anti- *C. pseudotuberculosis*, were determined total and differential count of leukocytes the periferic blood and the levels of production of interferon- $\gamma$  by cells of the total blood. Six experimental groups were used as follows: GI ovary hysterectomized + *C. pseudotuberculosis*; G II estrogen + *C. pseudotuberculosis*; GIII estral cycle + *C. pseudotuberculosis*; G IV - Progesterone + *C. pseudotuberculosis*; G V- male animals + *C. pseudotuberculosis*; G VI - Control. The results obtained due to the use of the antigen secreted as a revealer of the activation of the humoral and cellular components in the immune response of the goat host, in comparison with the averages of the rates of IFN- $\gamma$  production amongst the collection of various experimental groups, did not present differences ( $p > 0,05$ ). The difference was not very significant either amongst the responses of the rates of the antigen with the mitogen PWM and with PBS. It was observed in the females a reduction of the total number of leukocytes that was below the normal average of the species; and in the group of male animals, there was an increase in the number of total leukocytes, compared with the control group and with the leukocitary averages described in literature. One can conclude that the physiological alterations observed in females and males can be caused by the hormones that were used in the respective experimental groups. It was not observed a influence ( $p > 0,05$ ) over the serical levels of IgG and IgM immunoglobulines amongst the experimental groups treated.

However, the specific IgG antibodies were well characterized with a difference ( $p < 0,05$ ) between the groups infected experimentally and the group not infected (control).

Key Words: Responses humoral and cellular, Leukogram, Immunoglobulines, Interferon gamma, Caprines.

## LISTA DE TABELAS.

### Manuscrito 01

Tabela 1. Valores de referência do leucograma na espécie caprina. p. 25

Tabela 2. Constituição dos grupos experimentais p. 27

### Manuscrito 03

Tabela 1. Constituição dos grupos experimentais p. 68

Tabela 2 – Índice de estimulação de células de sangue total caprino infectado experimentalmente com *C. pseudotuberculosis* sob efeito dos hormônios da reprodução em resposta a antígeno secretado; mitógeno (PWM) e PBS. Os dados representam médias de densidade óptica dos dias de coletas dos grupos experimentais de cultura celular após 24 horas.

p. 73

## LISTA DE GRÁFICOS.

Manuscrito 01

GRÁFICO 1. Leucócitos: média dos resultados de três leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo – mais ou menos o desvio padrão (dp) de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G IV = fêmeas tratadas com nogestomet; G V = machos; G VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo VI).

p. 31

GRÁFICO 2. Linfócitos: média dos resultados de três leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo mais ou menos o desvio padrão (dp) de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G IV = fêmeas tratadas com nogestomet; G V = machos; G VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo VI).

p. 32

GRÁFICO 3. Monócitos: média dos resultados de três leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo mais ou menos o desvio padrão (dp) de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G IV = fêmeas tratadas com nogestomet; G V = machos; G VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo VI).

p. 33



GRÁFICO 4. Neutrófilos: média dos resultados de três leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo mais ou menos o desvio padrão (dp) de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G IV = fêmeas tratadas com norgestomet; G V = machos; G VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo VI).

p. 34

GRÁFICO 5. Eosinófilos: média dos resultados de três leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo mais ou menos o desvio padrão (dp) de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G IV = fêmeas tratadas com norgestomet; G V = machos; G VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo VI).

p. 35

GRÁFICO 6. Basófilos: média dos resultados de três leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo mais ou menos o desvio padrão (dp) de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G IV = fêmeas tratadas com norgestomet; G V = machos; G VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo VI).

p. 36

## Manuscrito 02

GRÁFICO 1. Avaliação das médias e desvio padrão do índice de densidade óptica de imunoglobulina IgG anti *C. pseudotuberculosis* dos dias após tratamento dos grupos experimentais.

p. 77

GRÁFICO 2. Avaliação das médias e desvio padrão do índice de densidade óptica de imunoglobulina IgG total dos dias após tratamento dos grupos experimentais.

p. 57

## Manuscrito 03

GRÁFICO 1. Perfil do índice de produção de IFN- $\gamma$  de células de sangue total caprino infectado experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, sob efeito dos hormônios da reprodução, em resposta à estimulação por SPB. Os dados representam médias de densidade óptica dos dias de coletas dos grupos experimentais de cultura celular após 24 horas.

p. 74

GRÁFICO 2. Perfil do índice de produção de IFN- $\gamma$  de células de sangue total caprino infectado experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, sob efeito dos hormônios da reprodução, em resposta à estimulação por mitógeno (pwm). Os dados representam médias de densidade óptica dos dias de coletas dos grupos experimentais de cultura celular após 24 horas.

p. 75

GRÁFICO 3. Perfil do índice de produção de IFN- $\gamma$  de células de sangue total caprino infectado experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, sob efeito dos hormônios da reprodução, em resposta à estimulação por antígeno secretado. Os dados representam médias de densidade óptica dos dias de coletas dos grupos experimentais de cultura celular após 24 horas.

p. 76

## 1.0 INTRODUÇÃO

A importação de caprinos de raças, com elevada produtividade zootécnica, do hemisfério norte tem sido uma constante no Brasil, ocasionando perdas irreparáveis aos rebanhos nativos pela entrada de doenças exóticas aos animais das diversas raças que vêm sendo selecionadas e adaptadas ao ecossistema ao longo dos anos.

A linfadenite caseosa, doença infecto-contagiosa crônica com alta prevalência nos rebanhos de caprinos, causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um patógeno intracelular facultativo que acomete caprinos e ovinos, promove a formação de granulomas em linfonodos superficiais e internos, podendo ainda atingir órgãos como pulmões e fígado (AYERS, 1977; BENHAM; SEAMANE; WOODBINE, 1962; CAMERON; MINNAR, 1969; BATEY, 1986). Causa importantes perdas econômicas para os criadores (RIBEIRO, 1988), pode resultar em baixa eficiência reprodutiva como subfertilidade e menor número de crias por parto (PUGH, 1997), provocando em alguns casos a morte do animal (CAMPBELL, 1982; NAIRN, 1982; BATEY, 1986).

A identificação de caprinos e ovinos, infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* geralmente é dificultada pela baixa sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos existentes. Grande número desses testes têm sido descritos (BROWN, 1987; MENZIES; MUCKLE, 1989; SUTHERLAND, 1987; STING, 1998), mas na sua maioria são questionados e considerados bastante controversos por alguns autores como controle

confiável dos indivíduos infectados em programas de reprodução (SHREUDER, 1994; DERCKSEN, 2001).

Os avanços atuais de novas biotécnicas para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos têm sido cada vez mais utilizados, principalmente em caprinos que se diferenciam dos demais animais domésticos, por uma série de parâmetros reprodutivos. O ciclo sexual estacional, a indução e sincronização do estro de doadoras e receptoras, que são realizadas com hormônios xenogênicos, gonadotrofina sérica de égua (Ecg) e o hormônio folículo estimulante porcino (FSH), o Ecg após repetidas aplicações, causam formação de anticorpos na espécie, o que diminui gradativamente a resposta superovulatória nas doadoras (REMY, 1991; BARIL, 1992), sendo essa uma resposta humoral direcionada para o hormônio utilizado.

A implantação de programas zootécnicos nos caprinos, em geral, tem sido ineficiente em muitos casos, tendo em vista a difícil tarefa de identificação dos animais com infecção subclínica, de doenças como linfadenite caseosa, para que possam ser excluídos dos rebanhos. Um meio alternativo de imunodiagnóstico é avaliar a resposta mediada por células, considerando o fato da *C. pseudotuberculosis* ser um patógeno intracelular facultativo e a imunidade mediada por células ser um componente importante na resposta imune protetora (LAN, 1998). A disponibilidade desse tipo de teste poderia possibilitar o uso isolado ou associado à resposta humoral em um programa de erradicação de animais contaminados (ROTHEL, 1990; WOOD, 1991; 1992; WHIPPE, 1995).

Ponderações essas é que, após análise da literatura sobre a influência da indução da superovulação em animais portadores de linfadenite nos caprinos, evidenciou-se a não-existência de estudos preocupadas em avaliar as possíveis alterações na resposta imunológica em caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*, tratados com hormônios da reprodução.

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Aspectos da Linfadenite Caseosa

A linfadenite caseosa é causada por *Corynebacterium (Actinomyces) pseudotuberculosis*, antigamente denominado *C. ovis* caracterizado como bacilo cocóide Gram-positivo facultativo, patógeno intracelular de macrófagos e monócitos (LLOYD, 1998; PUGH, 1998), que pode ocasionar granulomas na pele (FUBINI; CAMPELL, 1983). Em vários animais, o microorganismo se dissemina por diferentes tecidos, principalmente dos linfonodos mediastínicos ou pulmões, resultando em doença respiratória caracterizada por dispnéia e taquipnéia. Os granulomas pulmonares constituem uma fonte potencial de contaminação do rebanho, quando há superpopulação, como acontece nos apriscos e em confinamentos. *C. pseudotuberculosis* pode sobreviver por período tão longo quanto 37 dias após sua drenagem em locais úmidos, escuros e que contêm matéria orgânica (PUGH, 1998; LLOYD 1998).

Os sinais de granulomas externos incluem tumefação cutânea e fistulas com aumento de tamanho dos linfonodos superficiais como os pré-escapulares e os pré-femorais que ocasionalmente drenam, o que pode ser intermitente e quase sempre constituído de material purulento espesso amarelo-esverdeado e de consistência pastosa (HAGAN, 1988). Esses nódulos cutâneos podem se apresentar em forma de cadeia ou como lesão solitária. No caso de granulomas viscerais, as tumefações torácicas podem causar dispnéia inspiratória ou ocluir o retorno venoso ao coração. Lesões abdominais podem causar tenesmo, estrangúria e, ocasionalmente, cólica. O principal sintoma de

granulomas internos é perda de peso crônica, com ou sem febre intermitente. Também ocorre subfertilidade, diminuição na produção de leite, nascimento de menor número de crias, baixo peso dos cordeiros à desmama, baixo desenvolvimento e, nos ovinos, menor produção de lã. Os sítios externos comuns incluem o espaço submandibular ou retromandibular e os nódulos pré-inguinal, pré-femoral e supramamário. As lesões de cabeça e pescoço são mais comuns e, nos caprinos, ao passo que em ovinos, há distribuição mais uniforme das lesões craniais e caudais, possivelmente em decorrência de ferimentos provocados pela tosquia. Infecções externas raramente causam enfermidade clínica, além da drenagem de granulomas, embora algum grau de caquexia possa ser observado (HAGAN, 1988; PUGH, 1997).

Em geral as bactérias que originam granulomas são capazes de sobreviver à fagocitose evitando que sejam destruídas pelas células do sistema imune. De modo alternativo, induzem resposta inflamatória que é limitada pelo hospedeiro mediante a formação de tecido fibroso. Os granulomas podem ser localizados, freqüentemente após a infecção de um ferimento, múltiplos ou distantes do local da infecção. Para que os granulomas se instalem em locais distantes, o microorganismo deve ser carregado pela corrente sangüínea ou pelos leucócitos. A enfermidade caracterizada por granuloma multifocais ou internos geralmente é decorrente de bacteremia transitória de baixo grau; os granulomas podem se formar no local da invasão ou, mais comumente, no linfonodo regional drenante (HAGAN, 1988).

Em pequenos ruminantes, a bactéria mais conhecida e diagnosticada na formação de granuloma é o *C. pseudotuberculosis*, causador da linfadenite. A infecção se mantém no rebanho pela resistência do microorganismo e presença de animais infectados que disseminam as bactérias a outros animais

por meio da excreção de material purulento de granulomas abertos. A infecção pode ocorrer por contatos direto ou indireto, mediante o uso comum de instalações ou de instrumentos contaminados (PUGH, 1997). A infecção é introduzida no rebanho quando se adquire um animal infectado, embora possa se instalar quando um rebanho não-infectado é transferido para área contaminada. Eqüinos, bovinos e humanos são susceptíveis. A infecção também ocorre após a ingestão ou inalação da bactéria e pela contaminação de um ferimento. Exceto para a infecção do trato respiratório inferior, é necessária uma lesão cutânea para a infecção bacteriana (HAGAN, 1988).

## **2.2 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS A PATÓGENO INTRACELULAR**

Nos primeiros estágios pós-infecção, os neutrófilos e macrófagos são as principais células envolvidas na resposta contra *C. pseudotuberculosis* (JOLLY, 1966; HARD, 1969). A presença desses tipos celulares foi demonstrada como crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e secundária (LAN, 1999). A bactéria é fagocitada por macrófagos não ativados que, progressivamente, degeneraram (HARD, 1972), iniciando a formação de granulomas, como mecanismo de defesa contra esse microorganismo. A aparente incapacidade dos macrófagos em eliminar o agente pode ser atribuída à ausência de produção de óxido nítrico, quando submetidos à estimulação com os componentes antigênicos de *C. pseudotuberculosis*, como sugeriram os estudos de BOGDAN (1997) com macrófagos pulmonares ovinos. Sendo o óxido nítrico um potente agente efetor na eliminação de patógenos intracelulares, o fato de não haver produção desse agente em resposta aos componentes dessa bactéria explicaria



o desenvolvimento de infecções exclusivamente crônicas observadas em pequenos ruminantes (GREEN, 1991).

A resposta imune adaptativa é iniciada quando a infecção supera os mecanismos de defesa inata. Essa resposta se torna efetiva somente após vários dias do início da infecção e envolve mecanismos humorais e celulares de proteção (JANEWAY; TRAVERS, 2000).

A proteção conferida por anticorpos foi demonstrada inicialmente, por imunização passiva de camundongos com soro de coelhos imunizados contra *C. pseudotuberculosis*. O efeito protetor foi associado à capacidade dos anticorpos atuarem contra a disseminação da bactéria (CAMERON; ENGELBRECHT, 1971).

GARG E CHANDIRAMANI (1985) avaliaram a resposta humoral e celular através da inoculação de sonicação celular *C. pseudotuberculosis* ou cepa viva inativada, em ovinos, concluindo que em ambos os casos induzia uma resposta primariamente humoral, apesar de se notar baixa imunidade celular. A utilização de células vivas, por sua vez, evocava uma resposta celular forte e uma resposta humoral menos intensa.

A imunidade para *C. pseudotuberculosis* é complexa e tem o envolvimento dos mecanismos humoral e celular da resposta imunológica em pequenos ruminantes.

A resposta imune ocorre da interação entre linfócitos T (LT) e B (LB) e monócitos/macrófagos que conduz à proliferação celular, produção de

anticorpos, diferenciação de células citotóxicas, o aumento da atividade microbicida e a diferenciação hematopoiética. A regulação dessa complexa rede de respostas imunológicas e inflamatórias depende principalmente da comunicação entre as células que participam e interagem, o que se consegue por meio de moléculas solúveis, as citocinas e receptores específicos (PETROVSKY, 2001).

A interação de mecanismos entre os sistemas imune e o neuro-endócrino vem sendo estudada (BERCZI, 1988), para explicar a comunicação bidirecional desses sistemas, mais evidente no aumento de secreções hipotálamo-pituitária, em função de processos que alteram a homeostase do organismo, como estresse, inflamação e infecção. As alterações da função imune, após estimulação neuro-endócrina, sugerem que a imunocompetência pode ser regulada pelos sistemas nervoso central e endócrino (SCHRIKANT; BENNESISTE, 1996; TURNBULL; RIVIER, 1999), via neurotransmissores, citocinas ou hormônios (PETROVSKY, 2001). A produção de citocinas está sob controle neurohormonal, pois os leucócitos expressam receptores opióides, adrenérgicos e colinérgicos, significando que o sistema imune e outros sistemas são mutuamente dependentes (SCHRIKANT; BENNESISTE, 1996).

O SNC tem a capacidade de iniciar e regular respostas imunológicas, possuindo células que funcionam como apresentadoras de antígeno, como os astrócitos e micróglia (WILDER, 1995).

A atividade de outros eixos está também afetada pela resposta ao estresse, incluindo os sistemas hipotalâmico-pituitário-prolactina e hormônio do

crescimento, assim como o eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG) (KAKUCSAKA, 1994).

Os glucocorticóides influenciam o trânsito de leucócitos circulantes e inibem a expressão de moléculas de adesão e seus receptores correspondentes (CHROUSOS, 1995). Estudos anteriores mostram que o estresse agudo resulta na diminuição rápida e significativa do número e percentual relativo de linfócitos e monócitos no sangue circulante de ratos normais (DHABHAR, 1995; 1996).

A progesterona (P4) e o estrógeno suprimem *in vivo* e *in vitro* as reações imunológicas. A progesterona inibe a incorporação de timidina por linfócitos estimulados com fitohemaglutinina (PHA), e esse efeito ocorre no início do cultivo, indicando que o hormônio inibe o processo de ativação inicial dos LT. A P4 em combinação com a prostaglantina E (PGE) tem um efeito sinérgico sobre a resposta mitogênica de linfócitos periféricos humanos (MARGNI, 1996).

Os efeitos dos hormônios progesterona, corticotróficos, gonadotrofina, são fatores que também atuam como estimuladores de monócitos, exceto o estradiol. Com relação aos linfócitos, os efeitos mostraram ser supressores, exceto o dos hormônios corticotróficos que não ter efeito bem definido nos estudos (CONNOR; LEONARD, 1998).

Por outro lado, a ativação do sistema imune também produz alterações em estruturas endócrinas. Produtos derivados do sistema imune, citocinas encontram-se presentes, constitutivamente ou após indução, em glândulas endócrinas e em tecido neural (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

Há pouco mais de uma década, demonstrou-se a presença de receptores para P4 em células CD8<sup>+</sup> provenientes de mulheres grávidas. Esses linfócitos, em presença da P4, secretavam um fator inibidor, *Progesterone induced blocking factor* (PIBF), uma proteína de 34 Kd. O PIBF descrito em sistema humano e murino inibe a lise mediada por células NK, a proliferação de cultivo misto linfocitário, de gerar células com fenótipo e funções supressoras (SZEKERS-BAARTHO, 1981; MALAN-BOREL, 1996; 1997; 1998).

Quanto à influência hormonal sobre as células B, o cortisol e o hormônio adrenocorticotrópico inibem a síntese *in vivo* de anticorpos, em animais que foram imunizados com alguns antígenos concomitantemente e/ou posteriormente ao tratamento com os hormônios. O cortisol também inibe a fagocitose e deprime a inflamação (MARGNI, 1996).

As células B ativadas produzem citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , (linfotóxina alfa) e Gm-CSF. A mudança de isotipo de imunoglobulinas pode ser devido a citocinas liberadas por linfócitos T auxiliares, estimulados em determinadas circunstâncias. (DE FRANCO, 1999).

As citocinas são peptídios ativos que regulam o crescimento e a diferenciação celular em diversos processos biológicos e estão correlacionados ao desenvolvimento embrionário e à implantação de embriões no endométrio de mamíferos (SANCHEZ-CUENCA, 1999).

Muitos imunologistas têm resumido nos últimos anos os papéis descritos para as diversas citocinas identificadas na ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (MARGNI, 1996; YOKOYAMA, 1999; WEISS, 1999; BENOIST; MATHIS, 1999).

A produção de citocinas mediadoras da resposta imune inata e específica, que regulam a ativação e diferenciação linfocitária quanto às citocinas, participa da resposta inata através da regulação, ativação, crescimento e diferenciação de LT e LB (ALVAREZ, 1996).

O papel de muitas citocinas, descrito e estudado quanto a sua influência sobre o linfócito B ativado que produz a IL-4, inicialmente descrita como um fator estimulador de células B, parece mediar múltiplas funções biológicas numa variedade de tipos celulares. Por exemplo, está envolvida na indução de distintos isotipos de imunoglobulinas e na indução da expressão de antígenos MHC de classe II em células B. Além disso, estimula a proliferação de células T e sinergisa com a IL-3 para otimizar o crescimento de mastócitos (LENH, 1989).

Através de estudos imuno-histoquímicos realizados por ELLIS (1988), WALKER (1991) e PEPIN (1994), tem-se descrito a composição e a dinâmica celular do granuloma na patogenia da linfadenite caseosa. Os granulomas são formados internamente de um centro necrótico formando círculos até a periferia por área de macrófagos e de linfócitos limitado externamente por uma cápsula fibrótica.

Os estudos de PEPIN (1994) sobre a dinâmica de formação dos granulomas, após infecção experimental, sugerem que existe uma maior proporção de células T CD8 nos granulomas formados no sítio de inoculação em comparação àquelas observadas nos linfonodos drenantes. A evolução das lesões traduz-se pelo aumento relativo na proporção de células T CD em relação às células T CD4+ e, com o tempo de inoculação igual, existe uma

grande variabilidade individual, na relação CD4+ / CD8+ e na proporção de macrófagos de fenótipos variados. Este último ponto refletiu a influência dos padrões de citocinas produzidos pelos subtipos Th1 ou Th2 envolvidos na resposta imune.

A organização e composição celular dos granulomas provocadas pela infecção por *C. pseudotuberculosis* são similares àquelas observadas nas infecções por bactérias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (FLYNN, 1993) ou *Listeria monocytogenes* (NAKANE, 1989). Destaca-se a predominância dos linfócitos T CD8 (MODLIN, 1983), que atuam diretamente ou como células citotóxicas, ou como ativadoras de macrófagos via IFN- $\gamma$  (KAUFMANN, 1988), ou ainda, indiretamente, podendo apresentar um fenótipo supressor (MODLIN, 1988). Os estudos dos perfis de citocinas mostraram a grande importância das citocinas pró-inflamatórias o IFN-  $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , sobretudo no local inicial da infecção (PEPIN, 1997; ELLIS, 1991c), sendo o TNF- $\alpha$  de crucial importância na fase primária da infecção (LAN, 1998). ELLIS (1991c) ressalta que componentes não identificados de *C. pseudotuberculosis* seriam aparentemente responsáveis pela estimulação da produção de TNF- $\alpha$ , enquanto que PEPIN (1997) mostrou que a estimulação de IFN-  $\gamma$  e a formação de granulomas seriam independentes do fator de virulência *fosfolipase D*. Diferenças associadas ao tempo pós-infecção experimental quando os níveis da expressão dos genes para TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN-  $\gamma$  foram mais elevados no 7º dia que no 28º dia após a inoculação. Evidenciou a ligação entre formação de granulomas e expressão de algumas citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ , IL-2, IL-4 e MCP-1) sugerindo um papel importante na limitação da disseminação do patógeno.

O IFN- $\gamma$  tem papel importante contra viroses e patógenos intracelulares e na indução de resposta imune inflamatória (LIO, 2002), sendo produzido quase

exclusivamente pelos linfócitos T auxiliares (Th1) e pelas células NK depois de estimuladas (PRAVICA, 1999). Atua sobre monócitos e macrófagos e os ativa aumentando os mecanismos necessários para a lise intracelular dos microorganismos fagocitados, aumentando também sua atividade tumoricida (BOEHM, 1997).

Para o controle de infecções provocadas por bactérias, é de fundamental importância o recrutamento de um número maior de células fagocitárias, de moléculas efetoras ao local da infecção por liberação de citocinas e, para o seu controle, é produzido localmente nos sítios de proliferação da bactéria durante suas fases iniciais tendo grande impacto na resposta imune adaptativa que se desenvolve subsequente. KUBY E MUNRO (apud PAUL, 1999) demonstraram que tanto o IFN- $\gamma$  quanto o TNF- $\alpha$  possuem a capacidade de modular a migração celular atuando sobre a expressão de moléculas de superfície celular.

A imunidade inata na circulação materna durante a gestação humana foi estudada por SACKS (1999) que descreveu um aumento no número de monócitos e na sua capacidade fagocitária e um aumento plasmático de TNF $\alpha$ .

Quando ocorre uma lesão tissular extensa durante o processo inflamatório, é necessária a reparação com formação de fibrose. O IFN- $\gamma$  aumenta a síntese de colágeno e a sua deposição na matriz extracelular, além de aumentar a transcrição de outros genes da matriz colágena como a fibronectina (CARTWRIGHT, 1999).

A função protetora do TNF- $\alpha$  e do INF- $\gamma$  na resistência do hospedeiro a infecções por agentes intracelulares facultativos como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacteriu tuberculosis*, *M. bovis*, *Salmonella typhimurium* e *Rodococcus equi* foi descrita por NAKANE (1988) e FLYNN (1993).

LAN (1998) elucidou os papéis do TNF-  $\alpha$  e do IFN-  $\gamma$  na defesa contra *C. pseudotuberculosis*, avaliando a produção induzida pela infecção, e os efeitos *in vivo* da administração de anticorpos monoclonais para estas citocinas em camundongos. Demonstrou-se que tanto o TNF- $\alpha$  quanto o INF-  $\gamma$  são produzidos na fase inicial da infecção e que o TNF- $\alpha$  é produzido localmente nos sítios de proliferação da bactéria.

O IFN -  $\gamma$  é uma citocina extremamente pleiotrópica que possui uma importância inegável na regulação da resposta imune e dos processos inflamatórios. A capacidade de regular a indução da resposta imune, através do controle da expressão de moléculas do MHC classe I e II em vários tipos celulares importantes, a ativação e regulação da diferenciação das células T CD4+ estabelecem o IFN- $\gamma$  como um componente chave na determinação do tipo de função que se desenvolve durante o curso da resposta imune. Seu papel também é fundamental na defesa do hospedeiro contra infecções por agentes intracelulares. Diversos experimentos documentam a importância da produção do IFN-  $\gamma$  na indução dos mecanismos celulares de defesa (FARRAR e SCHREIBER, 1993);

As Imunoglobulinas G apresentam várias subclasses, as quais diferem em estruturas e atividades biológicas, como fixação de complemento



(AUGENER et al, 1971; NAHM, 1987) e ligação a células efectoras, com implicações patogénicas (HUBER, 1971).

No sistema murino, o IFN-  $\gamma$ , produzido *in vitro* por células Th1, induz IgG2a e IgG3 (FINKELAN, 1988; SNAPPER, 1992), interleucina-4 (IL-4), produzida por células Th2, estimula seletivamente IgG1 e IgE (FINKELAN, 1986). A ativação de células Th1 está associada com proteção contra infecções a patógenos intracelulares residindo dentro de macrófagos, enquanto que a ativação de células Th2 leva à progressão da doença através da diminuição das atividades de Th1 e aumento da resposta humoral (SCOTT, 1988; MOSMAN, 1986; SNAPPER; FINKELAN, 1986).

Embora as subpopulações Th1 e Th2 tenham sido identificadas com base no perfil de suas citocinas, ao contrário do que se sabe sobre regulação de subclasses IgG no camundongo, pouco se conhece a respeito do controle da expressão de subclasses IgG no caprino (SALGAME, 1991).

Devemos salientar que esses achados dependem de vários fatores, como maturidade e estado de ativação das células, além da presença ou não de outros estímulos (KING; NUTIMAN, 1993).

Poucos estudos têm sido realizados para compreender o desenrolar fisiológico das respostas imunológicas que ocorrem durante a indução hormonal de ovulação. Com o modelo caprino, os estudos são escassos e limitados. Justificando a necessidade de incrementar as pesquisas em transferências de embriões na espécie caprina, em condições de clima tropical, este trabalho tem como objetivos:

## 3.0 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento da resposta imunológica em caprinos, tratados com hormônios da reprodução e submetidos à infecção experimental com *C. pseudotuberculosis*.

### 3.2 Objetivos Específicos

1 – Avaliar a ação dos hormônios da reprodução (estrógeno; progesterona e hormônios do macho) sobre a resposta imune humoral de caprinos

- Comparar níveis séricos de anticorpos da classe IgG e IgG anti *C. pseudotuberculosis* em caprinos submetidos aos efeitos de hormônios da reprodução.

2 – Avaliar a ação dos hormônios da reprodução (estrógeno; progesterona e hormônios do macho) sobre a resposta imune celular de caprino.

- Quantificar e classificar os leucócitos de sangue periférico dos caprinos submetidos ou não à estimulação antigênica de *C. pseudotuberculosis* sob efeito dos tratamentos com hormônios da reprodução.

- Avaliar a produção de INF- $\gamma$ , *in vitro*, pelas células do sangue total de caprino, submetidos aos efeitos ou não dos hormônios da reprodução, em resposta à estimulação com antígeno secretado de *C. pseudotuberculosis*.

#### **4.0 MANUSCRITOS**

##### **4.1 MANUSCRITO 1**

**EFEITO DOS HORMÔNIOS DA REPRODUÇÃO SOBRE O QUADRO  
LEUCOCITÁRIO DE CAPRINOS (*Capra hircus*) INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM *CORYNEBACTERIUM*  
*PSEUDOTUBERCULOSIS***

**José Vasconcelos Lima OLIVEIRA,  
Maria Consuelo Caribé AYRES, MEYER Roberto,  
Songelí Menezes FREIRE .**

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar o leucograma de caprinos mestiços (*capra hircus*) foram coletadas amostras de sangue de 30 animais criados no Estado da Bahia, Brasil, distribuídos em 6 grupos, com 5 animais para cada tratamento: G I – Ovariectomizados + *C. pseudotuberculosis*; G II – Estrogênio + *C. pseudotuberculosis*; G III – Ciclo estral + *C. pseudotuberculosis*; G IV – Progesterona + *C. pseudotuberculosis*; G V – Animais machos + *C. pseudotuberculosis*; GVI – Controle (solução salina). Em cada animal foram coletadas seis amostras de sangue, em frascos contendo EDTA, em um período de 21 dias. Foi realizada contagem total e diferencial de leucócitos, dos animais controle e infectados com *C. pseudotuberculosis* sob o efeito dos hormônios progesterona, estrógeno e hormônios do macho. Observou-se nas fêmeas a redução do número total de leucócitos, ficando abaixo da média normal da espécie, enquanto que no grupo dos animais machos houve um aumento dessas células, comparando com o grupo controle e as médias leucocitárias descritas na literatura. Concluiu-se que as alterações fisiológicas nas fêmeas e nos machos podem ser causadas pelos hormônios utilizados nesta pesquisa.

**Palavras-chave:** Leucograma. Caprino. Imunologia.

## ABSTRACT

The blood samples of 30 crossbred caprines were collected in the State of Bahia, Brazil for the evaluation of the leukogram, the samples were then distributed in 6 groups with 5 animals for each treatment: GI – Ovary hysterectomized + *C. pseudotuberculosis*; GII – Estrogen + *C. pseudotuberculosis*; GIII – Estral cycle + *C. pseudotuberculosis*; GIV – Progesterone + *C. pseudotuberculosis*; GV – Male animals + *C. pseudotuberculosis*; GVI – Control (saline solution). Six blood samples were collected from each animal in flasks containing EDTA for a 21-day period. The following exams were made for the leukocitary analysis of caprines (*Capra hircus*) infected with *C. pseudotuberculosis* under the effect of the hormones progesterone; estrogen and male hormones: total number of leukocytes count and differential count of leukocytes. It was observed a reduction of the total number of leukocytes in the females, rate that was considered below the normal average of the species; and, in the group of male animals, there was an increase in the total number of leukocytes compared with the control group and the leukocitary averages described in literature. One concludes that the physiological alterations observed in females and males can be caused by the hormones used in the present research.

Key words: Leukogram. Caprine. Immunology.

## INTRODUÇÃO

A hematologia clínica destaca-se, entre os meios semiológicos, como auxílio dos veterinários no estabelecimento de diagnósticos e prognósticos, permitindo a avaliação das enfermidades dos animais e orientações aos tratamentos. A sua importância reconhecida comprova-se pelos numerosos trabalhos realizados, os quais destacam principalmente para a adequada interpretação do quadro leucocitário e sua utilização, pois é indispensável o conhecimento dos valores de referência dos constituintes do leucograma dos animais sadios (Tabela 1).

Dos fatores que influenciam o quadro hematológico, destacam-se os ambientais, uma vez que animais criados sob diferentes condições climáticas e de manejo podem apresentar evidentes variações dos elementos constituintes do hemograma (BIRGEL, 1969; 1982; MATOS, 1982; FERREIRA NETO, 1982; 1986; BARROS FILHO, 1997; VIANA, 2002).

Outros fatores de variabilidade que podem influenciar os constituintes do quadro leucocitário em caprinos, porém, pouco discutidos, são aqueles relacionados a sua fisiologia reprodutiva quando infectados pelo *C. pseudotuberculosis* (VERMA, 1990; MARQUES JÚNIOR, 1990; NFI, 1991; MBASSA; POULSEN, 1991; AZAB; KRAJNICKAKOVA, 1991; 1995).

A alta prevalência de linfadenite caseosa nos rebanhos de caprinos causa importantes perdas econômicas para os criadores (RIBEIRO, 1988), resulta em baixa eficiência reprodutiva como subfertilidade e menor número de crias por parto (PUGH, 1997), chegando a provocar a morte do animal, em alguns casos (CAMPBELL, 1982; NAIRN, 1982; BATEY, 1986). A doença infecto-contagiosa crônica causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um patógeno intracelular facultativo que acomete caprinos e ovinos, promove a formação de granulomas em linfonodos superficiais e internos, podendo ainda atingir órgãos como pulmões e fígado (BENHAM; SEAMANE; WOODBINE, 1962; CAMERON; MINNAR, 1969; AYERS, 1977; BATEY, 1986).

A região Nordeste do Brasil possui o maior rebanho de caprinos do país sendo o Estado da Bahia o que apresenta um número superior aos demais Estados, considerando que esses animais são essenciais para o sustento do pequeno agricultor (UNANIAN, 1986). A implantação dos programas zootécnicos nos caprinos da região é dificultada pela identificação dos animais com infecção subclínica por *C. pseudotuberculosis*, devido à baixa sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos existentes (SUTHERLAND, 1987; MENZIES; MUCKLE, 1989; SHREUDER, 1994; BROWN, 1997; STING, 1998; DERCKSEN, 2000). Novas biotécnicas têm sido utilizadas na melhoria da eficiência reprodutiva, principalmente nos caprinos, que se diferenciam dos demais animais domésticos por uma série de parâmetros reprodutivos (ROY, 1965; VIHAM; RAI, 1987; REMY, 1991). O ciclo sexual estacional, a indução e sincronização do estro de doadoras e receptoras, que são realizadas com hormônios xenogênicos, gonadotrofina sérica de égua (Ecg) e o hormônio folículo estimulante porcino (FSH-p), induzem a variação da



resposta superovulatória nas doadoras (FORTAGNE; SHAFER, 1989; BARIL, 1992; AZAB; ABDEL-MAKSOUND, 1999).

O entendimento da influência na fertilidade de animais portadores de linfadenite em programas reprodutivos e a dificuldade de compreensão de como esta doença poderá alterar a resposta imune no quadro leucocitário destes animais foi o que motivou o desenvolvimento deste estudo.

TABELA.1 Valores de referência do leucograma na espécie caprina.

Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /ml)	Valores Relativos (%)						Valores Absolutos (ul)						Referência
	BAST.	NEUT.	LINF.	MON.	EOSIN	BASO.	BAST.	NEUT.	LINF.	MON.	EOSI.N.	BASO.	
5,0 a	0	36	58	2	3,5	0	-	-	-	-	-	-	COFFIN., 1953
3,0 6,0 a	0 - 2	a	50	1 - 2	3 - 8	0-2	-	-	-	-	-	-	SCHALM., 1958
16,0		48	70										
7,7	0	50,3	43,7	3,6	2,3	0	-	-	-	-	-	-	HOLMAN, et al., 1958
12,8	-	-	-	-	-	-	306	6,432	5,017	396	496	141	BIRGEL, 1969
6,0 a	raros	30 a	50 a	1-4	3-8	0-2	0 a	1.800 a	3000 a	60 a	180 a	0 a	FERREIRA NETO
16,0		48	70				320	7.680	11.200	640	1.280	320	et al., 1977
4,0 a	raros	30 a	50 a	0-4	1-8	0-2	raros	1200 a	2000 a	0 a	50 a	0 a	MATOS, et al., 1982
3,0		48	70					7200	9000	550	650	120	
1,3	raros	43	51	3	2	1	-	-	-	-	-	-	SMITH , 1994

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 caprinos mestiços, sadios, 25 fêmeas e 5 machos, com idade entre 20 e 48 meses, mantidos em capril, seguindo-se as normas de manejo em sistema de criação intensiva. Os animais foram vermifugados e examinados no início dos estudos e acompanhados clinicamente por meio de ficha clínica individual com observações diárias principalmente os linfonodos superficiais durante todo o período experimental. Para diagnóstico de gestação, foi realizada a ultrassonografia transretal, incluindo-se no experimento fêmeas não prenhes. Animais foram avaliados pelo teste imunoenzimático (ELISA) contra *C. pseudotuberculosis* e utilizados apenas os negativos para *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram separados aleatoriamente em seis grupos e identificados por brincos (Tabela 2).

No início do experimento, os grupos foram inoculados com  $1 \times 10^9$  UFC (padrão de unidade de colônia) de uma cepa selvagem de *C. pseudotuberculosis*, com exceção dos animais do grupo VI (controle), proveniente do Laboratório de Microbiologia do ICS/UFBA (MOURA-COSTA, 2002), por via dérmica na região inguinal esquerda, e por escarificação da pele e gotejamento do inóculo da mesma cepa na região direita (PAULE, 2003).

Os animais do grupo I foram ovariectomizados 90 dias antes do experimento. Nos animais do grupo II foram administrados, a cada 48 horas, 2,5 mg de valerato de estradiol (Intervet), por via intramuscular, durante todo o

experimento. Nos animais do grupo II, III e IV, 72 horas antes de começar o experimento, foi administrado por via intramuscular 0,75mg de d-cloprostenol (Preloban-Intervet), independentemente do peso vivo. Os animais do grupo IV, foram submetidos ao tratamento hormonal de progesterona, com a implantação subcutânea, na orelha direita, de 1,5 mg de nogestomet<sup>1</sup> (17 alfa acetoxi-11 $\beta$ -metil-19 norpregna-4EN 3.20 diona) (Crestar-Intervet), os quais foram mantidos por todo experimento. O grupo V foi composto por cinco machos em idade reprodutiva e o grupo VI (animais controle) recebeu apenas o tratamento com solução salina.

TABELA 2. Constituição dos grupos experimentais

Grupos	Animal n = 5	Tratamentos
G I	1; 2; 3; 4; 5;	OVARIECTOMIZADOS + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G II	6; 7; 8; 9; 10	ESTROGENO + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G III	11;12;13;14;5	CICLO ESTRAL + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G IV	16;17; 18;19; 20	PROGESTERONA + <i>C.pseudotuberculosis</i>
G V	21 22; 23; 24;25	MACHOS + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G VI	26;27;28;29;30	CONTROLE ( solução salina)

Seis amostras de sangue foram colhidas de cada animal, nos dias 0, 5, 9, 13, 16 e 21 correspondendo a um período de ciclo estral. O dia zero corresponde ao dia que antecedeu o início dos procedimentos experimentais nos grupos descritos. As amostras sanguíneas foram colhidas por punção da veia jugular externa, utilizando-se o sistema para colheita a vácuo, com agulhas 25 x 8 contendo etileno diamino tetracetato tripotássico (EDTA-K<sub>3</sub>) a 15% para as contagens do número total e diferencial de leucócitos.

A contagem do número total de leucócitos foi realizada manualmente em Câmara de Neubauer, sendo as amostras de sangue diluídas, em pipeta hematimétrica de Thomas, na proporção de 1:20, utilizando-se como solução diluidora o líquido de ácido acético a 4%, de acordo com as recomendações de BIRGEL (1969). Foram confeccionados esfregaços sanguíneos para a contagem diferencial de 100 leucócitos, após coloração com corante de Rosenfeld, contados e classificados de acordo com suas características morfológicas. A contagem do número total de leucócitos foi realizada em duplicata e obtendo-se a média aritmética das contagens. O tratamento estatístico dos resultados obtidos nos vários grupos experimentais foi realizado pela análise de variância (Anova) e teste de comparação de médias e dos desvios padrão dos diferentes grupos nos dias de coleta, com intervalo de confiança de 95%.

## RESULTADOS

Alterações no número e proporções dos leucócitos sanguíneos, durante a realização do experimento, foi o modelo utilizado para análise da resposta imunológica sobre o quadro leucocitário de caprinos infectados com *C. pseudotuberculosis*, sob o efeito dos hormônios da reprodução. As médias obtidas para as variáveis analisadas no dia zero, antes do início do experimento, não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos, com exceção do número total de leucócitos, do grupo V, machos, que diferem ( $p < 0,05$ ) de todos os outros grupos. Conseqüentemente, quanto ao exame diferencial dos leucócitos, constata-se que os linfócitos foram as células responsáveis pela diferença ( $p < 0,05$ ) apresentada. Não houve diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os demais grupos para as variáveis estudadas no início do experimento.

A análise dos resultados obtidos nas coletas de 5 a 21 dias (Tabela 2) demonstra que em todos os grupos experimentais houve um aumento do número de leucócitos totais, mas não foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) no 5º dia após inoculação da cepa infectante e que esse número, no grupo V (animais machos), foi maior, apresentando uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos experimentais, considerando os dias 5º até o 21º dia de coleta.

O crescente aumento no número de leucócitos observado no grupo V, em todo o experimento, provavelmente em conseqüência à ação dos estímulos antigênicos da cepa infectante (Gráfico 1).

Na avaliação da contagem diferencial de leucócitos, não foram observadas diferenças estatísticas significantes ( $p > 0,05$ ) no número de linfócitos (Gráfico 2) entre os grupos, com exceção dos grupos V (machos) e VI (controle). Porém, as médias do número de linfócitos nas coletas ficaram abaixo da média normal da espécie, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ), no grupo I, na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas, grupo II, 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> coletas, grupo III, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> coletas, grupo IV, 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> coletas e, nos grupos V e VI, todas as coletas com as demais dos respectivos grupos experimentais (Tabela 2).

Com relação à variável monócitos (Gráfico 3), foram observadas diferenças ( $p < 0,05$ ), apenas nos dias 5 e 9 (2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> coletas), tanto entre as coletas, como entre os grupos experimentais e o controle. Porém, antes do início do experimento não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos.

Para o número de neutrófilos (Gráfico 4), verificou-se ligeira elevação dessas células, apresentando uma discreta neutrofilia a partir do 5<sup>o</sup> dia de inoculação com diferença ( $p < 0,05$ ) no grupo I, na 5<sup>a</sup> coleta e nos grupos V (machos) e VI (controle), em todas as coletas (Tabela 2).

Constatou-se um menor número de eosinófilos nos dias de coleta, após a infecção experimental (Gráfico 5), apresentando diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais e o controle. Quanto aos basófilos, do mesmo modo, foi observada uma ligeira diminuição no número das células após a inoculação, entretanto dentro dos valores normais da espécie (Gráfico 6).

Na avaliação das alterações observadas nos granulócitos (eosinófilos, basófilos e neutrófilos), durante o estudo, foram observadas entre grupos diferenças ( $p < 0,05$ ).

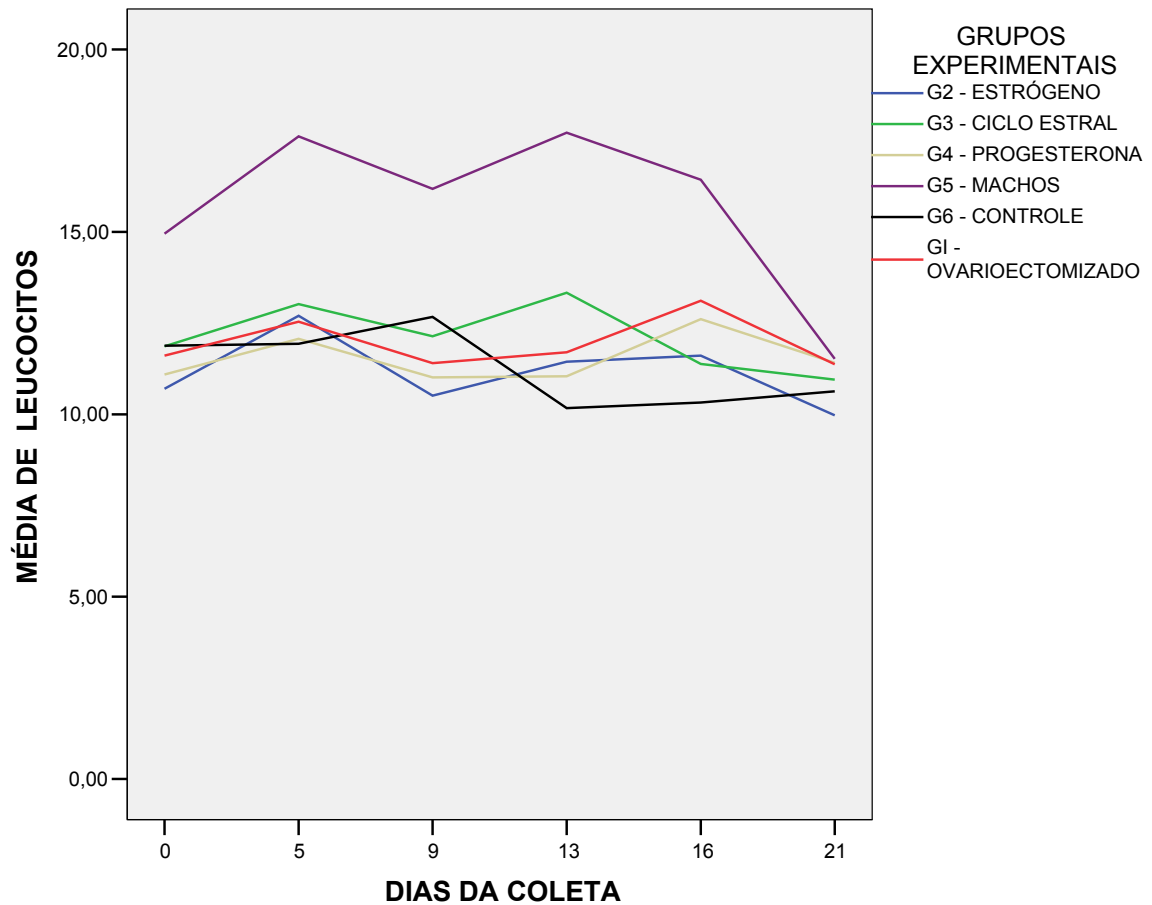


GRAFICO 1. Leucócitos: média dos resultados de duas leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G-I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G-II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G-III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G-IV = fêmeas tratadas com nogestomet; G-V = machos; G-VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo controle.



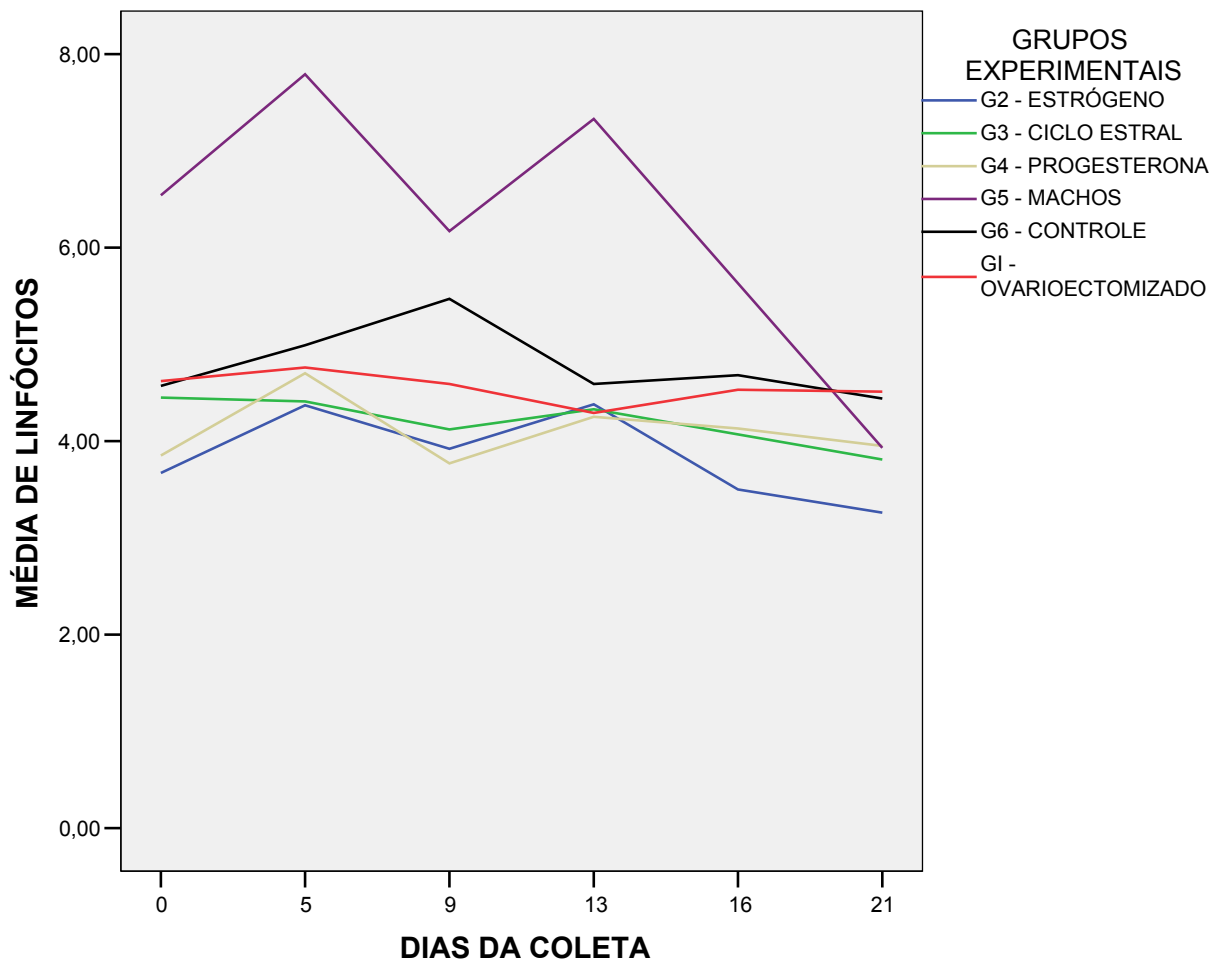


GRAFICO 2. Linfócitos: média dos resultados de duas leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G-I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G-II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G-III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G-IV = fêmeas tratadas com nogestomet; G-V = machos; G-VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo controle.

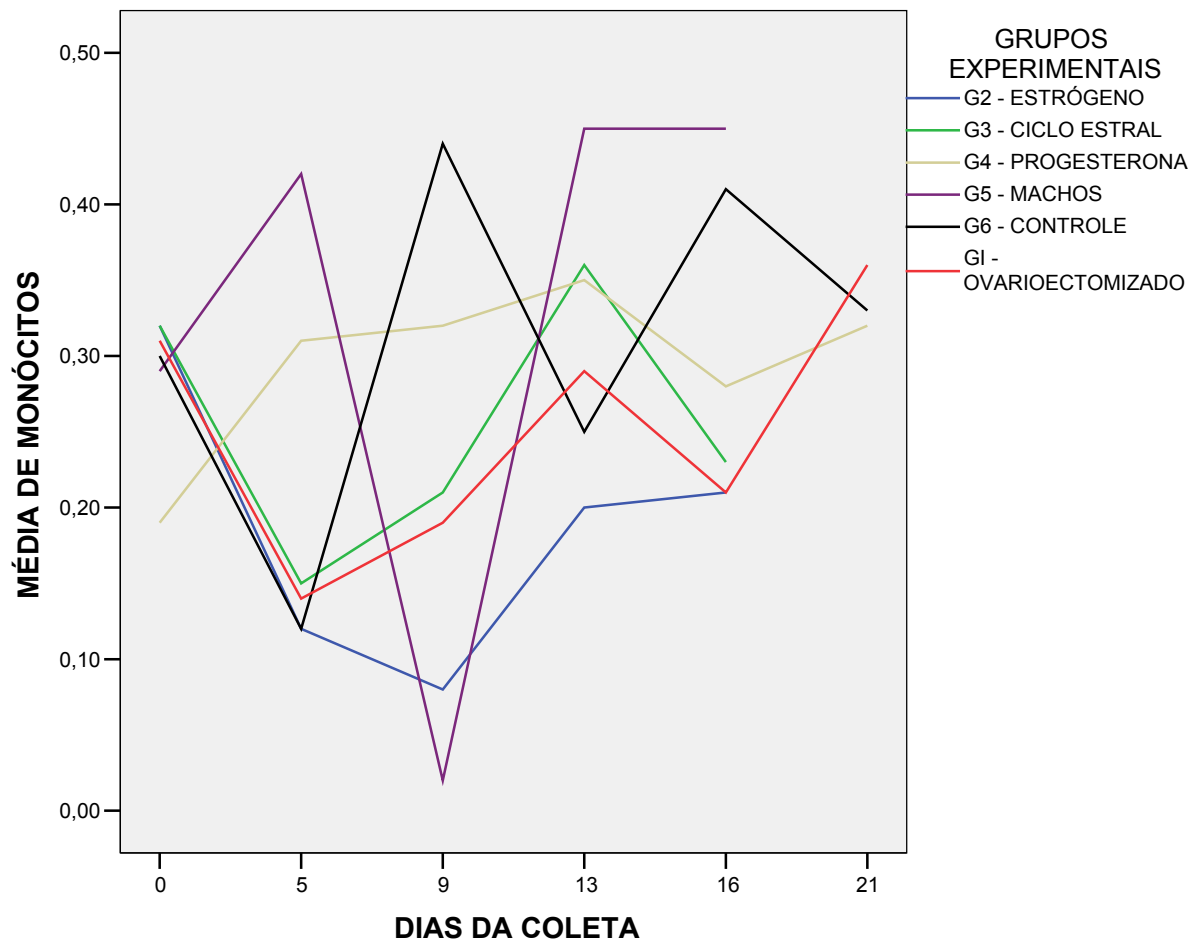


GRAFICO 3. Monócitos: média dos resultados de duas leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G-I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G-II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G-III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G-IV = fêmeas tratadas com norgestomet; G-V = machos; G-VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo controle.

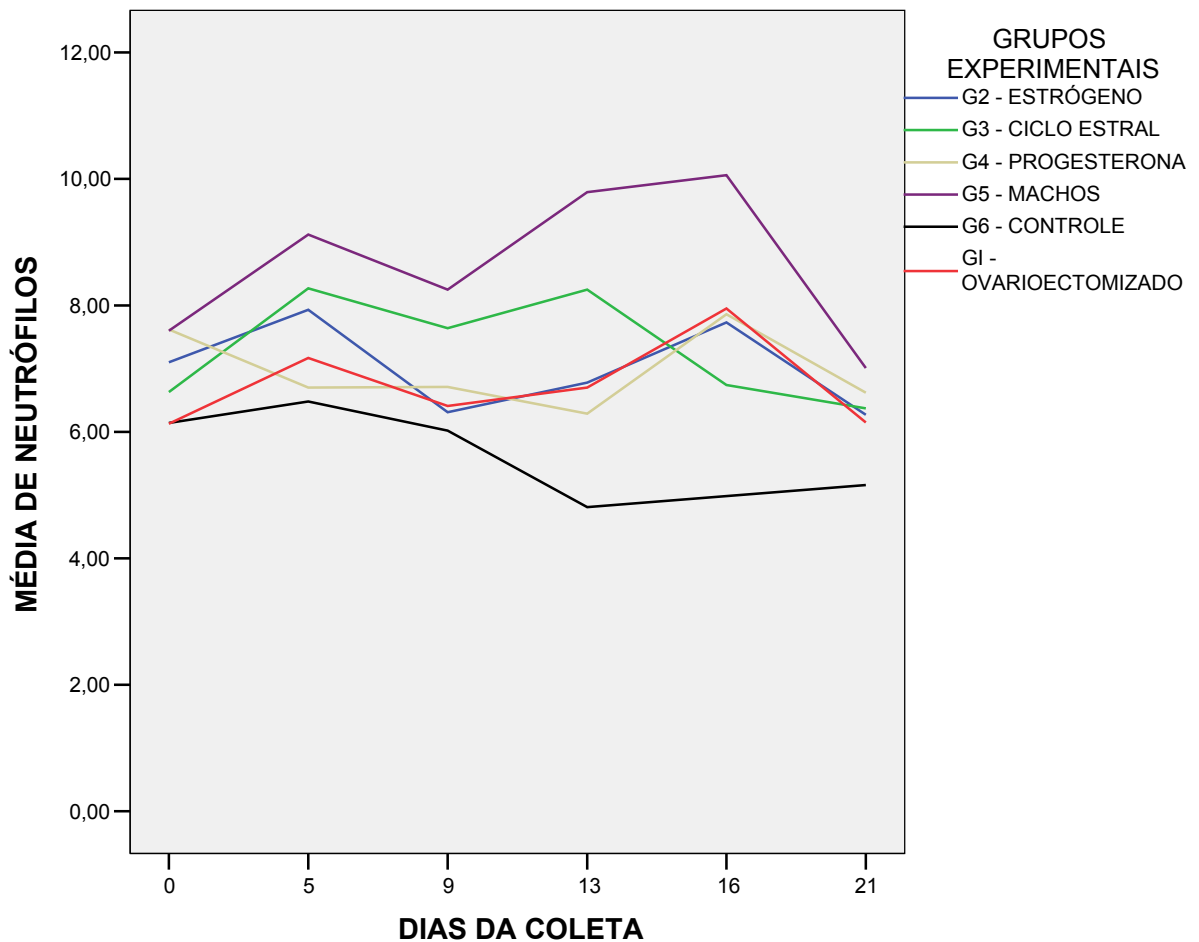


GRAFICO 4. Neutrófilos: média dos resultados de duas leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G-I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G-II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G-III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G-IV = fêmeas tratadas com nogestomet; G-V = machos; G-VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo controle.

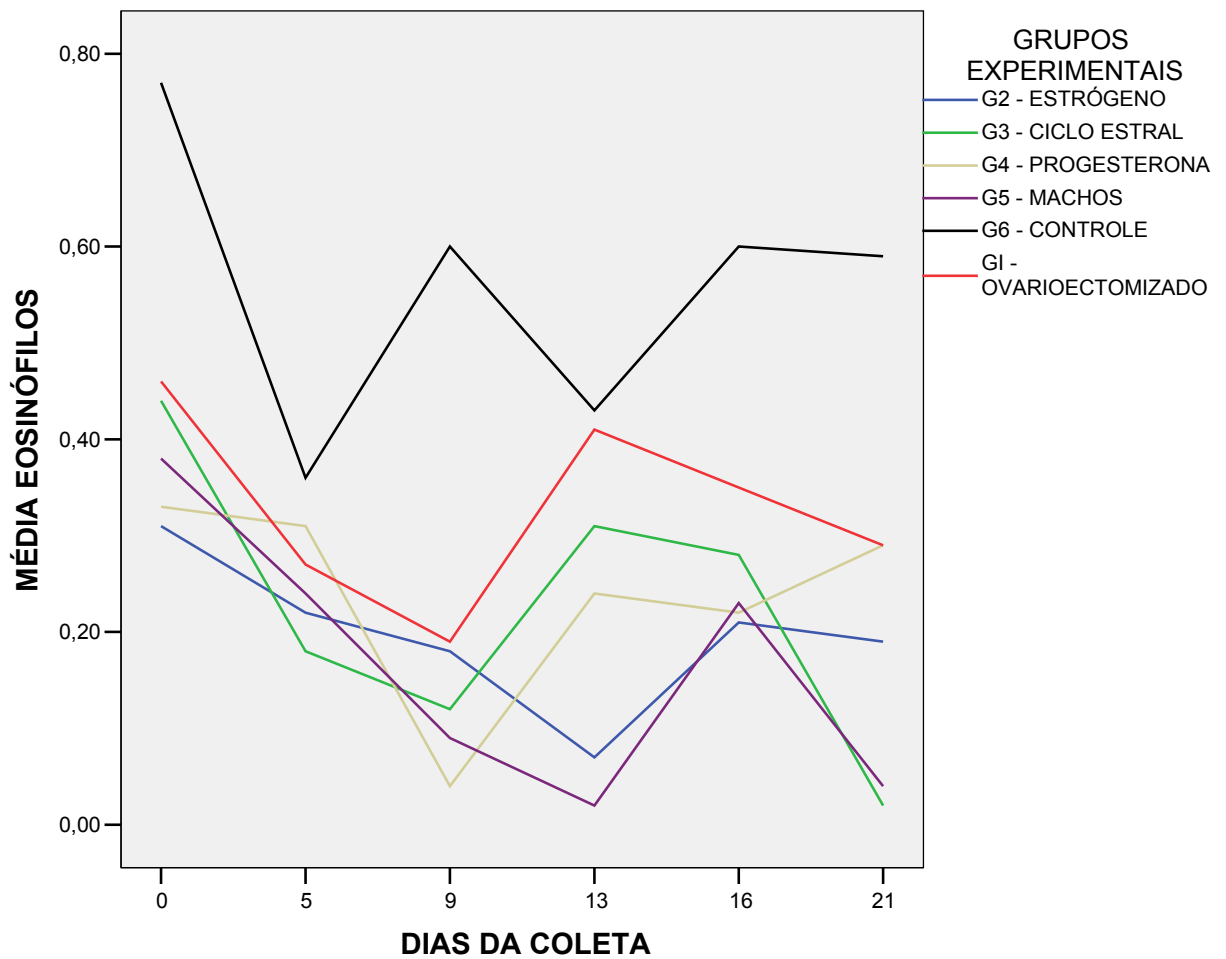


GRAFICO 5. Eosinófilos: média dos resultados de duas leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G-I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G-II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G-III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G-IV = fêmeas tratadas com nogestomet; G-V = machos; G-VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo controle.

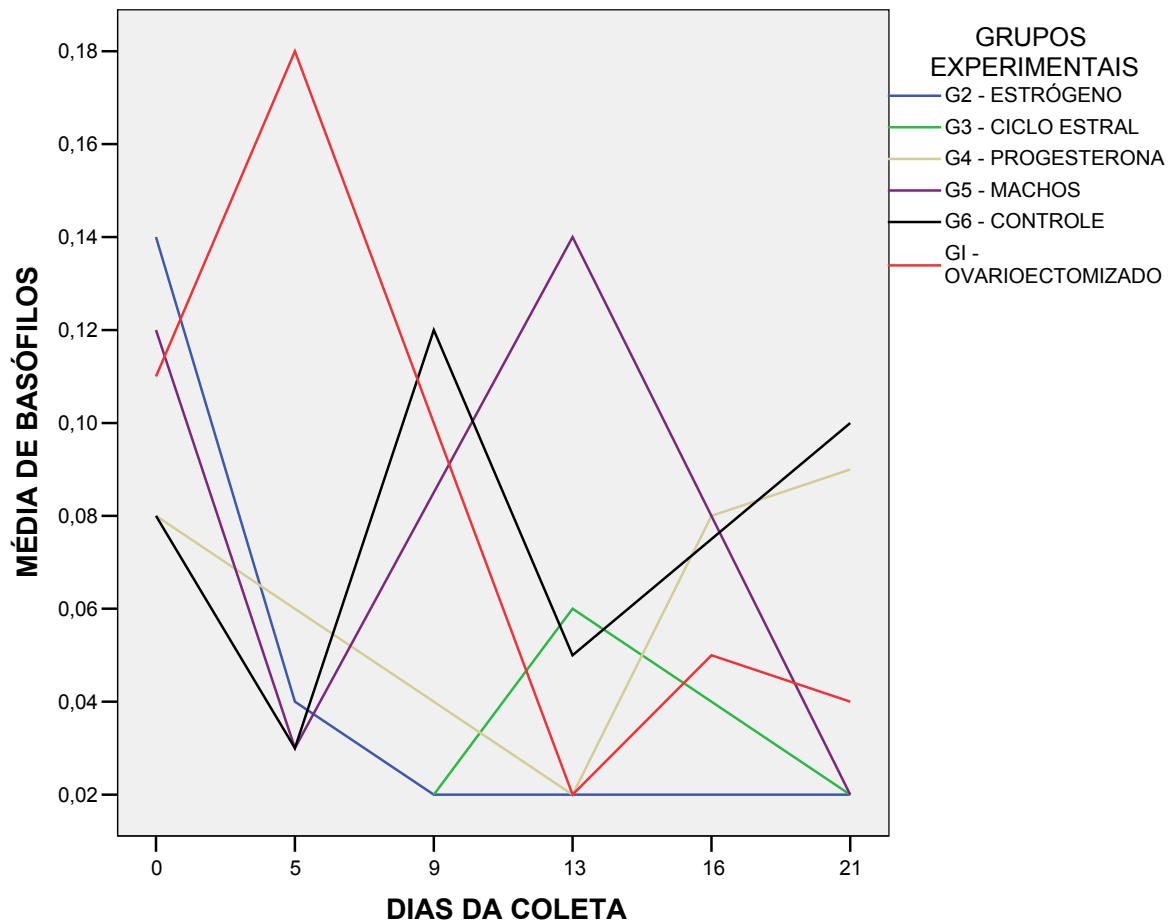


GRAFICO 6. Valores dos constituintes do leucograma: média dos resultados de duas leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G-I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do começo do protocolo experimental; G-II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G-III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G-IV = fêmeas tratadas com norgestomet; G-V = machos; G-VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo controle.

## **DISCUSSÃO**

Nos estudos do quadro de leucócitos nos animais domésticos, constatou-se que pesquisas são necessárias para esclarecer e determinar os fatores causadores de variações nos valores dos constituintes do leucograma. Devem ser avaliados fatores como as raças, a idade, bem como as condições de manejo, gestação, puerpério e de ambiente (VIANA, 2002).

Os resultados do estudo demonstraram associação com os trabalho de DREAU (1999), que afirmou que o estresse e hormônios induzem alterações significativas no número relativo de leucócitos no sangue.

As alterações no número de leucócitos circulantes observadas neste estudo sugerem efeito do estresse constante, representado pela infecção experimental. Autores demonstraram alterações no tráfego de leucócitos sanguíneos durante condições estressantes diversas, através da recirculação dessas células dos compartimentos periféricos (linfonodos, baço e outros tecidos) para o compartimento central (sangue periférico). O estímulo estressante estaria recrutando células no sentido de aumentar a vigilância inespecífica sobre o organismo suscetível, preparando-o para se defender de possíveis ameaças, como citam DHABHAR (1997), SHREUDER (1994) E STEFANSKI (2000).

Como o sistema imune é altamente responsivo ao estresse agudo, uma resposta fisiológica é imediatamente desencadeada. Acredita-se ainda que a rapidez da redistribuição dos leucócitos dos tecidos linfóides para o sangue periférico seja regulada também pela ação do sistema nervoso simpático, principalmente através de receptores beta-adrenérgicos na superfície dessas células, de acordo com MILLS (1995).

Observa-se alta associação entre leucócitos totais e granulócitos, tanto entre os grupos estudados quanto entre os dias de coleta, demonstrando que o aumento do número de leucócitos circulantes ocorreu, principalmente, por um aumento no número de granulócitos, representados principalmente pelos neutrófilos.

Os linfócitos sanguíneos estão presentes em uma concentração de 3.000 a 11.200 células/ul nos caprinos (FERREIRA NETO, 1997) e representam, portanto, cerca de um terço de todos os leucócitos periféricos. No entanto, cada linfócito vive a maior parte da sua vida em tecidos sólidos, entrando na circulação apenas para migrar de um local de repouso para outro. Cerca de 98 a 99% dos linfócitos vivem em órgãos linfóides especializados, onde desempenham a maior parte das suas funções. Como os linfócitos são células migratórias, a sua distribuição no organismo reflete as taxas de entrada e saída de um local para outro, bem como a sua multiplicação local. Os linfócitos geralmente permanecem na circulação durante apenas alguns minutos ou horas antes de se estabelecerem temporariamente em outro órgão linfóide.

STROBER E FUSS (2000) afirmaram que as incessantes migrações dos linfócitos desempenham várias funções, dentre elas a constante monitoração de todo o corpo à procura de focos de infecção ou qualquer outro desafio.

O significativo aumento no número de linfócitos absolutos, imediatamente após o pico inicial da resposta imune, no 9º dia (3ª coleta), sugere um efeito hemodinâmico importante, provocado além da administração dos hormônios. Deve-se considerar a presença do estresse provocado pela infecção experimental. Isso é esperado no início dos processos inflamatórios ou tóxico-infecciosos. No entanto, a discreta, mas significativa redução dessas células nos dias 13, 16 e 21, (4ª, 5ª e 6ª coletas), com relação ao grupo controle, sugerem uma influência dos hormônios da reprodução utilizados na observação de alterações do quadro leucocitário.

Os monócitos constituem cerca de 1 a 4% de todas as células sanguíneas nucleadas. Essas células circulam no sangue temporariamente, cerca de 1 (um) dia, antes de estabelecerem residência permanente em um tecido, onde são denominados de macrófagos e desempenham papel crucial na iniciação e coordenação de quase todas as respostas imunológicas adquiridas. A ativação dos macrófagos pode ocorrer em resposta a muitos estímulos diferentes, principalmente a citocinas.

Quanto aos monócitos avaliados antes da redução significativa de seu número nos diferentes grupos e a tendência à redução observada na 3ª coleta (9º dia), sugerem que o estresse promovido pelo microorganismo infectante influenciou na distribuição dessas células na corrente sanguínea. No entanto, não foram encontrados estudos correlacionando a influência de *C. pseudotuberculosis* na distribuição dos monócitos sanguíneos, apesar da importância ou participação inquestionável dessas células em diversas enfermidades (STROBER; FUSS, 2000).



Os neutrófilos são fagócitos circulantes equipados para responderem rapidamente e em grande número toda vez que houver uma lesão tecidual e outros tipos de estímulos agudos. Na corrente sanguínea, sua média é de 12 horas.

Diante da ausência de referência sobre possíveis influências imunológicas durante as várias fases reprodutivas nos caprinos para compararem-se os resultados relacionados ao número total de leucócitos obtidos, recorreu-se aos resultados dos grupos de animais não gestantes, e na sua fase inicial de gestação, citados por BIRGEL (1969), FERREIRA NETO (1982; 1986), MATOS, (1982), MARQUES JÚNIOR (1983), UNANIAN (1986), VERMA, (1990) E BARROS FILHO (1997), verificando-se uma discordância nos valores das médias neste trabalho para o número total de leucócitos, os quais foram inferiores aos descritos na literatura mencionada. Porém, deve-se ressaltar que as alterações fisiológicas hormonais, ocorridas durante o período inicial da gestação, diferem das ocorridas durante o período dos procedimentos experimentais, como o uso dos hormônios estrógeno e progesterona, que estão em acordo com MARGNI; MALAN-BOREL (1996) E KRAJNICKAKOVA (1995) quanto à afirmação de que tanto a progesterona quanto o estrógeno deprimem *in vitro* e *in vivo* as reações imunológicas, demonstrando assim uma cinética leucocitária na fisiologia dos caprinos.

Um aumento do número de leucócitos totais, no 5º dia após inoculação da cepa infectante, caracteriza uma resposta imunológica inata. Foi observado em todos grupos experimentais um discreto quadro leucocitário predominantemente neutrofílico a partir do 5º dia de experimento, nos grupos I, II, IV e V em relação ao grupo controle, fato esse que está em concordância com a literatura para caprinos adultos (BIRGEL, 1969; BARROS FILHO,

1997), o que não foi observado nos dias 10º e 13º, no Grupo III. Contudo ROY (1965), SHREUDER (1994), FORTAGNE; SCHAFER (1989), AZAB; ABDEL-MAKSOUUD (1999) não verificaram influência da gestação sobre o número de linfócitos. O estudo apresentou uma média do valor do número de linfócitos abaixo dos valores normais da espécie, nos grupos III e V, nos dias 10º e 13º, nos grupos III e VI, no 16º dia, e nos grupos I e VI em relação aos demais grupos experimentais, estando de acordo com DHABHAR (1995; 1996). O autor cita que o estresse agudo resulta numa diminuição rápida e significativa do número e relativo de linfócitos e monócitos no sangue circulante. SZEKERS-BAARTHO (1991) E MALAN-BOREL (1996; 1997; 1998) demonstraram a presença de receptores para progesterona em células CD8+ provenientes de mulheres grávidas e afirmaram que esses linfócitos, em presença da progesterona, secretavam um fator inibidor *Progesterone induced blocking factor* (PIBF).

A análise dos resultados demonstrou que o número relativo de eosinófilos diminuiu, nos grupos experimentais em relação ao controle, como também os monócitos apenas nos dias 5 a 10 após a infecção, coincidindo com uma resposta inata, conforme JOLLY (1966) e HARD (1969), que afirmam ser os neutrófilos e macrófagos como as principais células envolvidas na resposta contra *C. pseudotuberculosis* como primeiro estágio pós-infecção. A presença desses tipos celulares foi demonstrada como crítica no estabelecimento de uma resposta protetora à infecção primária e também secundária por LAN (1998). Entretanto, a imunidade inata na circulação materna durante a gestação humana foi abordada e revisada por SACKS (1999), que descreveu um aumento no número de monócitos e na sua capacidade fagocitária.

Os basófilos não apresentaram alteração dos valores normais para a espécie (FORTUGNE; SCHAFER (1989), MARQUES JÚNIOR (1990), VERMA (1990), MBASSA; POUSEN (1991), AZAB; ABDEL-MAKSOUUD (1999)).

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na avaliação da influência dos hormônios da reprodução sobre o leucograma de caprinos infectados experimentalmente por *C. pseudotuberculosis* possibilitaram as seguintes conclusões:

As alterações fisiológicas causadas pelos hormônios nas fêmeas podem ser a causa da redução do número total de leucócitos, que ficaram abaixo da média normal da espécie, caracterizando um quadro de estresse, que através dos seus constituintes hormonais poderá levar à baixa fertilidade na espécie através da predisposição a degenerações dos ovócitos nas fêmeas.

No grupo composto por animais machos, houve um aumento do número total dos leucócitos, onde os hormônios masculinos possivelmente determinaram aumento do número total de leucócitos, que ficaram acima da média normal da espécie, podendo determinar nos machos uma maior resistência a infecção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA**, Schaumburg, v. 171, p.1251-1254, 1977.

AZAB, E. M.; ABDEL-MAKSOUND, H. A. Changes in some hematological and biochemical parameters during prepartum and postpartum periods in female Baladi goats. **Small Rumin. Res.**, v. 34 (1), p.77-85,1999.

BARIL, G. Possibilidades naturais da transferência de embriões em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1992.

BARROS FILHO, I. R. et al. Leucograma de cabras soropositivas para o vírus da artrite encefalite dos caprinos na região metropolitana de Curitiba-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997.

BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v.63, p.269-272, 1986.

BENHAM, C.L.; SEAMAN ; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **Commonw. Bur. An. Healt.**, Inglaterra, v. 32, p.645-657, 1962.

BIRGEL, E. H. **Estudo do quadro leucocitário de caprinos (*Capra hircus*, L.) normais, criados no Estado de São Paulo:** influência dos fatores raciais, sexuais, etários e alimentares. 1969. 113 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1969.

\_\_\_\_\_. Hematologia Veterinária. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária.** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, S. E. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. **Can. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 46-49, 1987.

CAMERON, C. M.; MINNAR, J. L.; PURDON, M. R. Immunizing properties of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cell walls. Onderstepoort. **J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 36, n. 2, p. 211-216, 1969.

CAMPBELL, S.G., ASHFAQ, M. K., J.J. Caseous lymphadenitis in goats in the USA. In: Third International Conference on Goat Production and Disease, Tucson, **Proceedings**, Tucson, p. 449-454, 1982.

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

DHABHAR, F. S. et al. Effects of stress on immune cell distribution: dynamics and hormonal mechanisms. **J. Immunol**, v. 154, p. 5.511-5.527, 1995.

DHABHAR, F. S. et al Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behav. Immun**, v. 11, p. 286-306, 1997.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Change in blood leucocyte distribution: interactions between catecholamine and glucocorticoid hormones. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, p. 213, 1999.

DHABHAR, F. S. et al. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leucocyte trafficking. **NYAS**, v. 917, p. 876-93, 2000.

DREAU, D. et al. Effects of social conflict on immune responses and E. Coli growth within close chambers in mice. **Physiol. Behav**, v. 76, p. 133-40, 1999.

FERREIRA NETO, J. M.; BIONDINI, J.; CARVALHO, M. M. Leucograma de caprinos confinados e em pastoreio semi-extensivo. **Arq. Esc. Méd. Vet. UFMG**, v. 34 (2), p. 221-227, 1982.

FERREIRA NETO, J. M. et al. Hemograma de caprinos do nascimento até um ano de idade. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zoot.**, v. 38 (5), p. 645-656, 1986.

FORTAGNE, M.; SCHAFER, M. Hamatologische Parameter der Probstheidaer Kleinziege in Abhangigkeit von Graviditat Laktation. **Arch. Exp. Veterinarmed.**, v. 43, p. 223-230, mar. 1989.

HARD, G. C. Immunity to experimental infection with *Corynebacterium ovis* in the mouse peritoneal cavity. **Res. Vet. Sci.**, v. 10, p. 547-554, 1969.



JOLLY, R. D. Some observations on surface lipos of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **J. Appl. Bact.**, v. 29(1), p. 189-196, 1966.

KRAJNICA KOVA, M. et al. Dynamic changes in hematological parameters in the blood of sheep at estrus synchronization and in subsequent period of early: pregnancy. **Vet. Méd.**, v. 40(6), p. 177-180, 1995.

LAN, D. T. B. et al. Role of endogenous tumour necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 42, p. 863-870. 1998.

MALAN-BOREL, I. et al. Modulation of the humoral immune response of placental secretory factors. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 35, p. 529-533, 1996.

MALAN-BOREL, I. et al. Effect of rat placental culture supernatants on cellular and humoral immune responses **Am. J. Reprod. Immunol**, v. 38, p. 366-373, 1997.

MALAN-BOREL, I. et al. Modulation of the immune response by progesterone induced lymphocyte factors. **Scand. J. Immunol.** (SJI-GM486), n 6 , p. 278-284, 1998.

MARGNI, R. A; MALAN-BOREL, I. Inmunología de la reproducción. In: \_\_\_\_\_. **Inmunología e Inmunoquímica**: fundamentos. 5. ed. Editorial Médica Panamericana, 1996.

MARQUES JÚNIOR, A . P.; LIMA, W. S.; SAMPAIO, I. B. M. Leucograma de cabras adultas e jovens mantidas em confinamento e semi-confinamento. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v. 35, n. 3, p. 331-41, 1983.

MARQUES JÚNIOR, A . P.; SILVA, T. M. F.; BATISTA, R. A. Hemograma de cabras leiteiras nos períodos pré e pós-parto, mantidas em confinamento. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v. 42, n. 3, p. 187-195, 1990.

MATOS, M. S. et al. Hemoglobina, volume globular e leucócitos em caprinos. **Arq. EMV-UFBA**, Salvador, v. 7 (1), p. 82-90, 1982.

MBASSA, G. K.; POULSEN, J. S. D. Influence of pregnancy, lactacion and environment to haematology profiles in Danish Landrace dairy goats (*Capra hircus*) of different parity. **Comp. Biochem. Physiol. – B.**, v. 100 (2), p. 403-412, 1991.

MENZIES, P. I., MUCKLE, C. A. The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *C. pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. **Can J. Vet. Res.**, v. 53, p. 313-318, 1989.

MILLS, P. J. et al. Lymphocyte subset redistribution in response to acute experimental stress: effects of gender, ethnicity, hypertension and the sympathetic nervous system. Br. **Behav. Immun**, v. 9, p. 61-69, 1995.

MOURA COSTA, L. F. et al. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **RBSPA** Salvador, v. 3 (1), p. 1-9, 2002.

NAIRN, M. E. et al. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: International Conference on Goat Production and Disease, Tucson, **Proceedings**, Tucson, p. 455-457, 1982.

NFI, A. N. Haematological reference values and other blood characteristics of small ruminants at Mankon-Cameroon. I. Haematological values. **Bull. Anim. Health. Prod. Afr.**, v. 39, p. 243-245, 1991.

PAULE, B. J. A. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of pseudotuberculosis primary infection in goats, kinetics of IgG and interferon- production, IgG avidity and antigen recognition by western blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 96, p. 128-139, 2003.

PUGH, D. G. Caseous lymphadenitis in sheep. In small ruminants, **pract. Noph Am Vet Conf Alabama**, v.11, p. 982, 1997.

REMY, B. et al. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle stimulating hormone. **Theriogenology**, v. 36, p. 389-399, 1991.

RIBEIRO, C. et al. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. **Pesq. Vet. Brás.**, Rio de Janeiro, n. 8, p. 27-29, 1988.

ROY, A.; SAHNI, K. L.; DATTA, I. C. Studies on certain aspects of sheep and goat husbandry: VII Variations in blood corpuscles of sheep and goat during different seasons, pregnancy, parturition and post-parturition period. **Indian J. Vet. Sci.**, v. 35, v.1, p. 24-32, 1965.

SACKS, G.; SARGENT, I; REDMAN, C. An innate view of human pregnancy. **Immunol.**, v. 3, p. 114, 1999.

SAS INSTITUTE. **SAS**, Cary, v. 9, 2000.

SCHREUDER, B. E. C.; TER LAAK, E. A.; DERCKSEN, D. P. Eradication of Caseous Lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed ELISA technique. **Vet. Rec.**, v. 135, p. 174-176, 1994.

STEFANSKI, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. **Psyconeuroendocrinol**, v. 25, p. 389-406, 2000.

STING, R.; STENG, G.; SPENGLER, D. Serological studies on *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Vet. Med.**, v. 45, p. 209-216, 1998.

STROBER, W.; FUSS, I. J. O sistema imunológico das mucosas. In: \_\_\_\_\_. Stites DP, Terr AI, Parslow TH. **Imunologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 152-162, 2000.

SUTHERLAND S. S., ELLIS, T. M., MERCY, A. R. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Aust. Vet. J.**, v. 64, p. 263-266, 1987.

SZEKERS-BARTHO, J.; CSERNUS, V.; PEJTSIK, B. Progesterone as immunologic blocking factor in human pregnancy serum. **Reprod. Immunol.**, v. 3, p. 333-339, 1991.

UNANIAN, M. M. Parâmetros sanguíneos em caprinos jovens da região semi-árida do Nordeste do Brasil. **Pesqui. Agropec. Brás.**, v. 21,n.3, p. 293-301, 1986.

VERMA, A . K.; PANDIT, R. K.; NEMA, S.P. Certain observations on parturition process in local goats. **Indian Vet. J.**, New Delli, v. 67 (4), p. 376-377, 1990.

VIANA, R. B. et al. Influência da gestação e do puerpério sobre o leucograma de caprinos da raça Saanen, criados no Estado de São Paulo. **Vet. Res. Anim. Sci**, v. 39 n. 4, p. 196-201, 2002.

VIHAM, V. A.; RAI, P. Certain hematological and biochemical attributes during pregnancy, parturition and post-parturition periods in sheep and goats. **Indian J. An. Sci.**, v. 57, n.11, p. 1200-1204, 1987.

## 4.2 MANUSCRITO 02

### NÍVEIS SÉRICOS DE IgG TOTAL E ANTI *C. PSEUDOTUBERCULOSIS* EM CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* SOB O EFEITO DOS HORMONIOS DA REPRODUÇÃO.

JOSÉ VASCONCELOS LIMA OLIVEIRA<sup>1</sup>, ROBERTO MEYER<sup>2</sup>, THEREZA CRISTINA CALMON DE BITENCURT<sup>1</sup>, ROBSON C. BAHIA<sup>3</sup>, RENATO CARMINATI<sup>3</sup>, SONGELI MENEZES FREIRE<sup>2</sup>.

- 
1. Professor Adjunto do Departamento de Patologia e Clínicas da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia EMEV/UFBA-40170-110-Salvador-Ba., jvasconc@ufba.br
  2. Professor Adjunto do Departamento de Bioagressão do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia ICS/UFBA-Salvador-Ba.
  3. Aluno do curso de pós-graduação em imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia ICS/UFBA-Salvador-Ba.

---

## RESUMO

---

Analisaram-se aspectos da resposta imune humoral do hospedeiro caprino infectado experimentalmente com *C. pseudotuberculosis* e submetido a diferentes condições hormonais, tendo como indicador desta resposta a quantificação de anticorpos da classe IgG e a cinética da resposta específica por esta classe, avaliada por ELISA. Foram utilizados 30 caprinos mestiços criados no Estado da Bahia, distribuídos em 6 grupos com 5 animais para cada tratamento: G I – Ovariectomizados + *C. pseudotuberculosis*; G II – Estrógeno + *C. pseudotuberculosis*; G III – Ciclo estral + *C.*

*pseudotuberculosis*; G IV – Progesterona + *C. pseudotuberculosis*; G V – Animais machos + *C. pseudotuberculosis*; G VI – Controle. Em cada animal foram coletadas seis amostras de sangue, em um período de 21 dias. Notaram-se variações significativas entre o quinto e o nono dia pós-infecção nos níveis séricos de imunoglobulinas IgG) entre os grupos experimentais tratados. Porém, os anticorpos específicos foram bem caracterizados com diferença significativa entre os grupos infectados experimentalmente e o grupo controle para IgG.

PALAVRAS-CHAVE: Imunoglobulina, caprino, ELISA, imunologia.

## ABSTRACT

Analyzed aspects of the humoral immune response of the caprine host experimentally infected with *C. pseudotuberculosis* and subjected to different hormonal conditions, having as an indicator of such response the quantification of IgG antibodies and the kinetics of the specific response for this class, evaluated via ELISA. Thirty crossbred caprines, which had been raised in the State of Bahia, Brazil, were used in the experiments. The animals were distributed in 6 groups with 5 specimens for each treatment: GI – Ovary hysterectomized + *C. pseudotuberculosis*; GII – Estrogen + *C.*

*pseudotuberculosis*; GIII – Estral cycle + *C. pseudotuberculosis*; GIV – Progesterone + *C. pseudotuberculosis*; GV – male animals + *C. pseudotuberculosis*; GVI – Control. Six blood samples were collected from each animal in a 21-day period. Significant variations between the fifth and the ninth day post-infection were observed in the serical levels of immunoglobulines (IgG) amongst the experimental groups that were treated. However, the specific antibodies were well characterized with a significant difference amongst the experimentally infected groups and the control for IgG group.

Key Words: Immunoglobulin, caprine, ELISA, immunology.

## INTRODUÇÃO

A linfadenite caseosa causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma doença caracterizada pela formação de granulomas em linfonodos superficiais e internos, podendo atingir órgãos como pulmões e fígado (CAMERON et al, 1969; AYERS, 1977; BATEY, 1986), resultando em baixa eficiência reprodutiva como subfertilidade e menor número de crias por parto (PUGH 1997) e, em alguns casos, a morte do animal (CAMPBELL et al, 1982; NAIRN et al, 1982).

Fatores de variabilidade influenciam a resposta imune celular, tais como a regulação das citocinas e a definição de moléculas alvo que constituem, portanto, aspectos importantes na compreensão dos mecanismos imunopatológicos da

linfadenite caseosa nos caprinos, porém, pouco discutidos, foram aqueles ligados à esfera da fisiologia dos períodos reprodutivos das fêmeas, tais como a gestação, o puerpério e a lactação (ROY et al, 1965; VIHAM; RAI, 1987; FORTAGNE; SCHAFFER, 1989; VERMA et al, 1990; MARQUES JUNIOR et al, 1990; MBASSA; POULSEN, 1991; AZAB; ABDEL-MAKSOUND, 1999; VIANA et al, 2002).

A progesterona e o estrógeno suprimem, *in vivo* e *in vitro*, as reações imunológicas, sendo que a primeira inibe a incorporação de timidina por linfócitos estimulados com fitohemaglutinina. Como este efeito ocorre no início do cultivo, isto pode indicar que este hormônio inibe o processo inicial de ativação do linfócito T. A progesterona em associação com a prostaglantina E tem efeito sinérgico sobre a resposta mitogênica de linfócitos periféricos e, em altas doses, é capaz de



mediar o prolongamento da implantação embrionária (MALAN-BOREL, 1998).

Mecanismos que levam a deficiência reprodutiva em caprinos ligados à linfadenite caseosa não estão bem esclarecidos. O presente estudo tem como objetivo analisar se a ação dos hormônios da reprodução pode provocar alterações nos níveis séricos de imunoglobulinas G totais e específicas contra *C. pseudotuberculosis* em caprinos infectados experimentalmente com esta bactéria.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 caprinos mestiços, com boa condição clínica e corporal, negativos para *C. pseudotuberculosis* selecionados através de ELISA, sendo 25 fêmeas não prenhes e 5 machos, com idade entre 20 e 48 meses. Os animais foram mantidos em capril, seguindo-se as normas de manejo em sistema de criação intensiva. Os animais foram separados aleatoriamente em seis grupos e identificados por brincos, vermifugados e examinados no início dos trabalhos e, semanalmente, observando-se principalmente os linfonodos. O diagnóstico de gestação foi realizado através da ultrassonografia transretal.

Os grupos, com exceção dos animais do grupo VI (controle), foram inoculados com  $1 \times 10^9$  UFC de uma cepa selvagem de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, (MOURA COSTA, 2002) por via intradérmica, 1mL na região inguinal esquerda e, após escarificação da pele, gotejamento de 1mL na região direita (PAULE, 2003).

Os animais do grupo I, através do método cirúrgico, foram ovariectomizados 90 dias antes do experimento. Nos animais do grupo II

foram inoculados a cada 48 horas, 2,5 mg de valerato de estradiol (Intervet), por via intramuscular, durante todo o experimento. Nos animais do grupo II, III e IV, 72 horas antes de começar o experimento, foi efetuada a aplicação de 0,75mg de d-cloprostenol (Preloban-Intervet), independentemente do peso vivo. Os animais do grupo IV foram submetidos ao tratamento hormonal com progesterona sendo implantado por via subcutânea na orelha direita 1,5mg de norgestomet (17 alfa acetoxi-11 $\beta$ -metil-19 norpregna-4EN 3.20 diona) (crestar-Intervet), mantido por todo experimento. O grupo V foi composto por cinco animais machos em idade reprodutiva e o grupo VI, animais controle, recebeu apenas o tratamento com solução salina.

Amostras de sangue com 5mL foram colhidas em cada animal por venipunção da jugular, nos dias 0; 5; 9; 13; 16 e 21 (correspondendo a um período de ciclo estral), permanecendo na temperatura ambiente por uma hora para retração do coágulo, sendo logo após centrifugadas a 700 x g, por 10 minutos. O soro foi distribuído em alíquotas de 200  $\mu$ l e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização. No final do experimento os animais foram examinados e coletado material para exame histopatológico.

Nos ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA) (PAULE, 2003), foram usadas placas de poliestireno de fundo chato (Costar 3590) sensibilizadas com 50 $\mu$ l do sobrenadante da cultura de 48h de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI, diluído a 1:100, em tampão carbonato bicarbonato 0,05M, pH 9,6, e incubadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Após duas lavagens com PBS contendo 0,1% de Tween-20, as placas foram bloqueadas com 200 $\mu$ l/poço de Tween-20 contendo 5% de leite desnatado, durante duas horas. A seguir, foram incubadas com 50 $\mu$ l/poço dos soros testes diluídos a 1:100 em PBS-T20 contendo 1% de leite desnatado, sendo incubada por uma hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após cinco

lavagens em PBS-T20, adicionou-se às placas 50µl de imunoglobulina de caprino, conjugada a peroxidase (DAKO), diluída a 1:10.000 em PBS-T20. As placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos e, em seguida, foram novamente lavadas cinco vezes em PBS-T20 e incubadas com 50µl/poço da solução reveladora (25 mL de tampão cítrico-fosfato pH 5,1 + ortofenilenodiamina 10mg + 10mL de de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%). A placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida acrescentando-se 25µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Para a detecção das imunoglobulinas anti *C. pseudotuberculosis*, o conjugado de coelho anti-IgG de cabra marcado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:40.000, as placas de microtitulação foram cobertas e bloqueadas como descritas no protocolo anterior.

Usados como controle positivo o soro de 31 animais infectados com *C. pseudotuberculosis* e o controle negativo, o soro de 52 animais não infectados, procedentes da mesma região.

A leitura foi realizada com filtro de 492nm densidade óptica (DO) em leitor de ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550). A definição do ponto de corte foi realizado de acordo com Frey (1998), com intervalo de confiança de 99,8%, (que corresponde à média acrescentada de três vezes o desvio padrão) sendo feita também a curva operacional relativa (ROC) (KABA, 2001).

A correlação entre o DO do ELISA para anticorpos, IgG anti *C. pseudotuberculosis* e IgG total foram estimados pelo teste de Spearman, e medida da associação entre as variáveis para reconhecimento qualitativo do antígeno através da análise estatística, pelos métodos não paramétricos de Kruskal–Wallis para a comparação das

médias de densidade óptica nas diferentes coletas dos grupos experimentais, com um nível de significância 95%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em animais infectados experimentalmente por *C. pseudotuberculosis* e submetidos ou não à ação dos hormônios da reprodução foram analisadas as respostas dos anticorpos IgG total e anti-IgG específicos. Considerando que a resposta imune do caprino dirigida contra *C. pseudotuberculosis* envolva componentes da imunidade inata (JOLLY, 1965; HARD, 1969) e adquirida (PEPIN, 1991; 1997 e ELLIS, 1995) a natureza dos antígenos protetores que ainda é desconhecida.

Verificou-se a presença de granulomas em doze animais. A histopatologia da análise dos fragmentos de tecidos linfonodal corados pela hematoxilina-eosina, revelaram perda da arquitetura normal do órgão, caracterizados pela presença de necrose caseosa, algumas já com focos de mineralização, associadas a intenso infiltrado de polimorfonucleares, com predomínio de neutrófilos, degenerados. Na periferia das áreas necróticas observou-se um halo com presença de macrófagos ativados e epitelióides e, mais externamente por linfócitos e alguns poucos plasmócitos, circundados por extensas faixas de tecido conjuntivo fibroso, também infiltrado por infócitos, características típicas de linfadenite caseosa.

Apesar de os resultados anátomo-patológicos terem demonstrado uma baixa intensidade de infecção, considerando aspectos clínicos e patológicos no número de granulomas encontrados, a resposta de anticorpos foi detectada em todos os animais. O indicador da cinética de resposta humoral foi através da sorologia por ELISA, IgG que apresentou um máximo de imunorreatividade no 5º e 21º

dia pós-infecção, aumentando até o final do experimento.

Os anticorpos IgG específicos contra antígenos de *C. pseudotuberculosis* apresentaram resultados altamente específicos pela ausência de estimulação nos animais não infectados (controle). Assim, foi possível reproduzir uma cinética de resposta já descrita em outros modelos de infecção por microorganismos intracelulares, ou seja, uma resposta rápida (5 dias) após infecção.

A densidade óptica (DO) do ELISA IgG específico foi semelhante entre as diversas amostras dos grupos na primeira coleta (dia 0) do experimento. Os níveis de anticorpos anti- IgG específicos apresentaram dois picos de resposta, dia 9 e 21, na maioria dos grupos. A média de DO, dos grupos IV (progesterona) e V (machos), na 2ª coleta o DO de IgG total e específico foram semelhantes e apresentaram diferenças ( $p < 0,05$ ) em relação aos

demais grupos. Porém esses grupos apresentaram títulos de anticorpos mais baixos que os demais grupos, dados que demonstram claramente possível influência dos hormônios da reprodução sobre as imunoglobulinas IgG. Esses resultados estão de acordo com as considerações de Malan- Borel (1998), onde relata que a progesterona e o estrógeno inibem as reações imunológicas.

A partir da 3ª coleta, também, houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre as coletas nos grupos, sendo todas diferentes ao grupo controle (Gráfico 1 e 2).

A correlação dessas variáveis apresentou um comportamento semelhante, com média DO positiva baixa entre IgG e total ( $r=0,4$ ) e a resposta imune do anticorpo IgG total demonstrou uma correlação mais alta com média alta positiva para IgG anti *C. pseudotuberculosis* ( $r=0,5$ ).

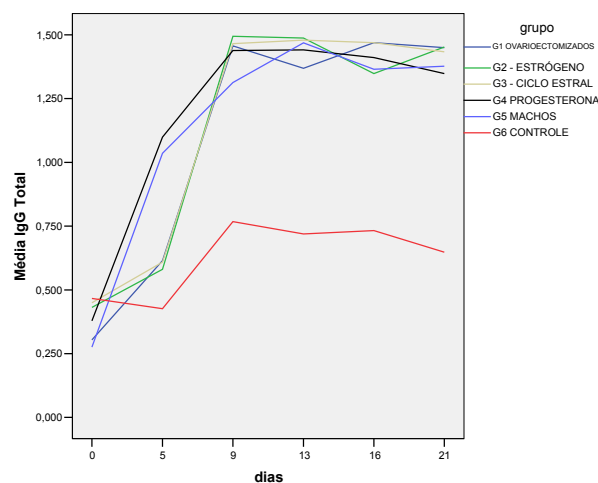
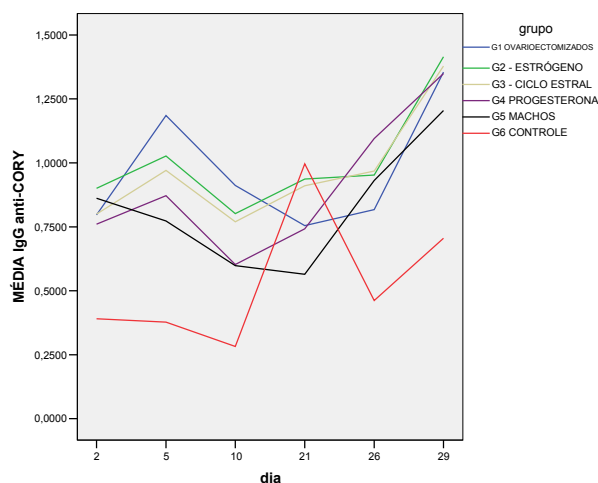


GRÁFICO 1.—Avaliação das médias do índice de densidade óptica de imunoglobulina IgG anti *C. pseudotuberculosis*, dos dias após tratamentos dos grupos experimentais.

GRÁFICO 2.—Avaliação das médias do índice de densidade óptica de imunoglobulina IgG total, dos dias após tratamentos dos grupos experimentais.

## CONCLUSÃO

Os níveis de IgG específicos entre os grupos infectados experimentalmente e o grupo controle apontam para a redução desta resposta nas fêmeas submetidas ao tratamento com progesterona.

Notou-se uma tendência de níveis mais baixo de IgG totais no grupo composto por machos.

A cinética da resposta imune, após infecção experimental por *C. pseudotuberculosis*, estabeleceu uma cronologia de intervenção de elementos da resposta humoral (produção de anticorpos específicos, reconhecimento antigênico) no hospedeiro caprino.

A fração do antígeno secretado por *C. pseudotuberculosis* utilizado no experimento contém estruturas antigênicas responsáveis pelo reconhecimento e ativação do componente humoral do sistema imune do hospedeiro caprino.

## REFERÊNCIAS

AYERS, J.L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA.**, Schaumburg, v. 171, p. 1251-1254, 1977.

AZAB, E. M.; ABDEL-MAKSOUND, H. A . Changes in some hematological and biochemical parameters during prepartum and postpartum periods in female Baladi goats. **Small Rumin. Res.**, v. 34, n. 1, p. 77-85, 1999.

BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v. 63, p. 269-272, 1986.

CAMERON, C.M.; MINNAR, J. L.; PURDON, M.R. Immunizing properties of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cell walls. Onderstepoort. **J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 36, n. 2, p. 211-216, 1969.

CAMPBELL, S.G.; ASHFAQ, M. K., J.J. Caseous lymphadenitis in goats in the USA. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3, 1982, Tucson. **Proceedings...** Tucson, 1982. p. 449-454.

ELLIS, J. A. et al. Local production of tumor necrosis factor alpha in *Corynebacterium pseudotuberculosis* pulmonary lesion in sheep. **Vet. Pathol.**, v. 32, n. 1, p. 68-70, 1995.

FORTAGNE, M.; SCHAFER, M. Hamatologische Parameter der Probstheidaer Kleinziege in Abhängigkeit von Graviditat Laktation. **Arch. Exp. Veterinarmed.**, v. 43, p. 223-230, mar. 1989.

FREY A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **J. Imm. Meth.**, v. 221, p. 35, 1998.

HARD, G. C. Immunity to experimental infection with *Corynebacterium ovis* in the mouse peritoneal cavity. **Res. Vet. Sci.**, v. 10, p. 547-554, 1969.

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

KABA, J.; KUTSCHKE, L.; GERLACH, G. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. **Vet. Microb.**, Amsterdam, v. 78, p. 155, 2001.

MALAN-BOREL, I. Et al. Modulation of the immune response by progesterone induced lymphocyte factors. **Scand. J. Immunol.** (SJI-GM486), 1998.

MARQUES JÚNIOR, A. P.; SILVA, T. M. F.; BATISTA, R. A. Hemograma de cabras leiteiras nos períodos pré e pós-parto, mantidas em confinamento. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zoot.**, v. 42, n. 3, p. 187-195, 1990.

MBASSA, G. K.; POULSEN, J. S. D. Influence of pregnancy, lactation and environment to haematology profiles in Danish Landrace dairy goats (*Capra hircus*) of different parity. **Comp. Biochim. Physiol. – B**, v. 100, n. 2, p. 403-412, 1991.

MOURA COSTA, L. F. et al. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **RBSPA**, Salvador-Bahia, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2002.

NAIRN, M. E. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE **Proceedings...** Tucson, 1982. p. 455-457.

PAULE, B. J. A. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: Kinetics of *pseudotuberculosis* primary infection in goats: Kinetics of IgG and interferon- $\gamma$  production, IgG avidity and antigen recognition by western blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol.** Amsterdam, v. 96, p. 128-139, 2003.

PÉPIN, M. et al. Histopathology of the early during experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs. **Vet. Microbiol.**, v. 29, p. 123, 1991

PEPIN, M. et al. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet. Res.** v. 28. p. 149-163, 1997.

PUGH, D. G. Caseous lymphadenitis in sheep in small ruminants, **Pract. North. Am. Vet. Conf.** Alabama, v. 11, p. 982, 1997.

ROY, A.; SAHNI, K. L.; DATTA, I. C. Studies on certain aspects of sheep and goat husbandry: VII variations in blood corpuscles of sheep and goat during different seasons, pregnancy, parturition and post-parturition period. **Ind. J. Vet. Sci.**, v. 35, n. 1, p. 24-32, 1965.

SAS INSTITUTE. **SAS**. Cary, 2000. Software, v.9.

VERMA, A . K.; PANDIT, R. K.; NEMA, S. P. Certain observations on parturition process in local goats. **Ind. Vet. J.**, v. 67, n. 4, p. 376-377, 1990.

VIANA, R. B. Influência da gestação e do puerpério sobre o leucograma de caprinos da raça Saanen, criados no Estado de São Paulo. **BRAZ, J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 39, n. 4, p. 196-201, 2002.

VIHAM, V. A.; RAI, P. Certain hematological and biochemical attributes during pregnancy, parturition and post-parturition periods in sheep and goats. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 57, n. 11, p. 1.200-1.204, 1987.

### 4.3 MANUSCRITO 03

**EFEITO DE HORMÔNIOS DA REPRODUÇÃO SOBRE A  
CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE INTERFERON- $\gamma$  EM CAPRINOS  
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR  
*CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS***

**OLIVEIRA José Vasconcelos Lima,  
PAULE Bruno Jean A. REGIS Lia Fernandes,  
MEYER Roberto, FREIRE Songeli Menezes .**

#### **RESUMO**

A compreensão dos mecanismos imunopatológicos da Linfadenite Caseosa nos caprinos constitui aspectos importantes na resposta imune celular, porém pouco discutidos são aqueles relacionados com a esfera reprodutiva das fêmeas. O propósito desse trabalho foi o de analisar as possíveis influências hormonais dos procedimentos utilizados nos programas de reprodução sobre a resposta imune celular de caprinos infectados experimentalmente por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, baseado na resposta da produção de IFN- $\gamma$  por células de sangue total *in vitro* aos antígenos celulares totais. Foram coletadas amostras de sangue de 30 caprinos mestiços criados no

Estado da Bahia, distribuídos em 6 grupos com 5 animais para cada tratamento: G I – Ovariectomizados + *C. pseudotuberculosis*; G II – Estrógeno + *C. pseudotuberculosis*; G III – Ciclo estral + *C. pseudotuberculosis*; G IV – Progesterona + *C. pseudotuberculosis*; G V – Animais machos + *C. pseudotuberculosis*; G VI – Controle. Foram coletadas de cada animal seis amostras de sangue, em um período de 21 dias. Os resultados obtidos demonstraram que a comparação das médias dos índices de produção do IFN- $\gamma$  entre as coletas dos diversos grupos experimentais não apresentou diferenças ( $p > 0,05$ ), como também entre as respostas dos índices do antígeno, mitógeno PWM e com PBS.

Palavras-chave: Interferon gama. Caprino. Imunologia.



## ABSTRACT

The understanding of the immunopathological mechanisms of Caseous Lymphadenitis in caprines is of the utmost importance in the cellular immune response. However, not thoroughly discussed yet remain those aspects related to the mechanisms related to the reproductive sphere of females. The aim of the present work was to analyze the possible hormonal influences of the procedures that are used in reproduction programs over the immune cellular response of caprines experimentally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, by using an assay with total blood, based upon the response of the production of IFN- $\gamma$  by cells of total blood *in vitro* to total cell antigens. Blood samples of 30 crossbred caprines raised in the State of Bahia, Brazil, were collected, the samples were then distributed in 6 groups with 5 animals for each treatment: G I Ovary hysterectomized + *C. pseudotuberculosis* ; G II – Estrogen + *C. pseudotuberculosis*; G III – estral cycle + *C. pseudotuberculosis*; G IV – Progesterone + *C. pseudotuberculosis*; G V – Male animals + *C. pseudotuberculosis*; G VI – Control. Six blood samples were collected from each animal for a 21-day period. The obtained results demonstrated that the comparison of the average of the production rates of IFN- $\gamma$  amongst the collection of the several experimental groups did not present differences ( $p > 0,05$ ), neither did the responses of the rates of antigen with the mitogen PWM and with PBS.

Keywords: Interferon gamma. Caprine. Immunology.

## INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa é uma doença infecto-contagiosa crônica causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um patógeno intracelular facultativo que acomete caprinos e ovinos, promovendo a formação de granulomas em linfonodos superficiais e internos (BENHAM; SEAMAN; WOODBINE, 1962; CAMERON, 1969; AYERS, 1977; BATEY, 1986).

A alta prevalência da linfadenite caseosa nos rebanhos de caprinos do Nordeste do Brasil causa importantes perdas econômicas para os criadores (RIBEIRO, 1988). Em vários animais o microorganismo dissemina-se em vários tecidos, principalmente nos linfonodos mediastínicos, levando, freqüentemente, à perda de peso corporal, com conseqüente deficiência reprodutiva (CAMPBELL, 1982; BATEY, 1986) ou pulmonar. Os granulomas pulmonares constituem fonte potencial de contaminação do rebanho, quando há superpopulação, como acontece nos apriscos e em confinamentos (NAIRN, 1982).

Fatores que influenciam a resposta imune celular, como a regulação das citocinas e a definição de moléculas alvo, constituem aspectos importantes na compreensão dos mecanismos imunopatológicos da linfadenite caseosa nos caprinos (ROY, 1965; VIHAM; RAI, 1987; FORTAGNE; SCHAFER, 1989; VERMA, 1990), como também aqueles ligados aos aspectos reprodutivos das fêmeas (MARQUES JUNIOR, 1990; MBASSA; POULSEN, 1991; AZAB;

ABDEL-MAKSOUND, 1999; VIANA, 2002), uma vez que alguns parâmetros reprodutivos diferenciam o manejo dos caprinos dos demais animais domésticos. O ciclo sexual estacional, a indução e sincronização do estro de doadoras e receptoras são realizados com hormônio como as gonadotrofinas (REMY, 1991; BARIL, 1992).

A interação de mecanismos recíprocos entre o sistema imune e o neuroendócrino tem sido bem estudada (PETROVSKY, 2001) e tem demonstrado que a comunicação que ocorre bidirecional entre os dois sistemas é mais evidente no aumento de secreções hipotálamo-pituitárias em função de processos que alteram a homeostase do organismo, como estresse, inflamação e infecção. As alterações da função imune, após estimulação neuroendócrina, sugerem que a imunocompetência pode ser regulada pelo sistema nervoso central (SNC) e endócrino (TURNBULL; RIVIER, 1999), via neurotransmissores, citocinas ou hormônios (PETROVSKY, 2001). A produção de citocinas está sob controle neurohormonal, o que é possível porque leucócitos expressam em sua membrana receptores opióides, adrenérgicos e colinérgicos (SCHRIKANT; BENVENISTE, 1996).

A resposta imune é fruto da interação entre linfócitos T (LT), linfócitos B (LB) e monócitos/macrófagos. Essa interação conduz à proliferação celular, à produção de anticorpos, à diferenciação de células citotóxicas, ao aumento da atividade microbicida e à diferenciação hematopoiética. A regulação dessa complexa rede de respostas imunológicas e inflamatórias depende principalmente da comunicação entre as células que participam e se interagem, o que se consegue por meio de citocinas destacando-se o IFN- $\gamma$  (BERCZI, 1998).

O IFN- $\gamma$  tem papel importante contra viroses e patógenos intracelulares e na indução de resposta imune inflamatória (LIO, 2002), sendo produzido quase exclusivamente pelos linfócitos T auxiliares (Th1) e pelas células natural killer NK depois do estímulo antigênico (PRAVICA,1999). O IFN- $\gamma$  atua sobre os monócitos e os macrófagos, ativando-os e com os mecanismos necessários para a lise intracelular dos microorganismos fagocitados, aumentando sua atividade tumoricida e os induzindo a liberar ao exterior uma maior quantidade de TNF- $\alpha$  (BOEHM, 1997). Os macrófagos ativados pelo IFN- $\gamma$  também aumentam a expressão de receptores para a porção Fc das IgG (Fc $\gamma$ R) e de antígenos HLA do MHC de classe II.

Na análise da literatura evidenciou-se a não existência de estudos que avaliem as influências dos hormônios da reprodução para detecção de IFN- $\gamma$ , em caprinos com linfadenite caseosa na avaliação da resposta imune celular.

Considerando esses dados, utilizou-se, como modelo para estudar a cinética da produção de IFN- $\gamma$  em caprinos infectados experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, sob o efeito dos hormônios progesterona, estrógeno e hormônios do macho, um ensaio com sangue total, com base na produção do IFN- $\gamma$ , estimulado por antígenos secretados. Determinaram-se os valores do ensaio, analisando a influência da resposta imune na reprodução dos caprinos em comparação com animais dos diferentes grupos experimentais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 caprinos mestiços, sadios, 25 fêmeas e 5 machos, com idade entre 20 e 48 meses, mantidos em capril, seguindo-se as normas de manejo em sistema de criação intensiva. Os animais foram vermifugados e examinados no início dos estudos, acompanhados clinicamente por meio de ficha clínica individual com observações diárias principalmente os linfonodos durante todo o período experimental. Para diagnóstico de gestação, foi realizada a ultrassonografia transretal, incluindo-se na amostra experimental fêmeas não prenhes. Animais foram avaliados pelo teste imunoenzimático (ELISA) contra *C. pseudotuberculosis* e utilizados apenas os negativos para *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram separados aleatoriamente em seis grupos e identificados por brincos (Tabela 1).

No início do experimento todos os animais dos seis grupos foram inoculados com  $1 \times 10^9$  UFC (padrão de unidade de colônia) de uma cepa selvagem de *C. pseudotuberculosis*, com exceção dos animais do grupo VI (controle), proveniente do Laboratório de Microbiologia do ICS/UFBA (MOURA-COSTA, 2002) por via dérmica, na região inguinal esquerda, e por escarificação da pele e gotejamento do inóculo da mesma cepa na região direita (PAULE, 2003).

Os animais do grupo I foram ovariectomizados 90 dias antes do experimento. Nos animais do grupo II foram administrados, a cada 48 horas, 2,5 mg de valerato de estradiol (Intervet), por via intramuscular, durante todo o experimento. Nos animais do grupo II, III e IV, 72 horas antes de começar o

experimento, foi administrado por via intramuscular 0,75mg de d-cloprostenol (Preloban-Intervet), independentemente do peso vivo. Os animais do grupo IV, foram submetidos ao tratamento hormonal de progesterona, com a implantação subcutânea, na orelha direita, de 1,5 mg de norgestomet (17 alfa acetoxi-11 $\beta$ -metil-19 norpregna-4EN 3.20 diona) (Crestar-Intervet), os quais foram mantidos por todo experimento. O grupo V foi composto por cinco machos em idade reprodutiva e o grupo VI por animais controle, que recebeu apenas o tratamento com solução salina.

TABELA 1. Constituição dos grupos experimentais

<i>Grupos</i>	<i>Animal</i>	<i>Tratamentos</i>
G I	1; 2; ;3; 4; 5;	OVARIECTOMIZADOS + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G II	6; 7 ;8 ;9; 10	ESTROGENO + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G III	11;12; 13; 14; 15	CICLO ESTRAL + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G IV	16;17; 18;19; 20	PROGESTERONA + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G V	21;22; 23; 24; 25	MACHOS + <i>C. pseudotuberculosis</i>
G VI	26 ;27;28 ;29 ;30	CONTROLE ( solução salina)

As amostras de sangue foram colhidas, nos dias 0; 5; 9; 13; 16 e 21, correspondendo a um período de ciclo estral. No dia zero do experimento, tiveram início os procedimentos experimentais nos diferentes grupos.

As amostras de sanguíneas foram colhidas por punção da veia jugular externa, utilizando-se para a coleta frasco com vácuo contendo heparina sódica, sendo mantido à temperatura ambiente e distribuído, em um período máximo de duas horas da colheita. Em placas para cultivo celular de 24 poços (Costar corporation, Cambridge, EUA) em triplicata, em cada poço foi depositado 1,5 mL de sangue e 30 $\mu$ g de antígeno secretado de *C. pseudotuberculosis*, na

concentração protéica de 20µg/mL padronizado previamente por PAULE (2003). O controle positivo foi incubado apenas com mitógeno “Pockweed” (PWM) na concentração de 2,5µg/mL, segundo padronização por REGIS (2002) e o controle negativo incubado apenas com PBS, sendo a incubação realizada a 37°C por 24 horas em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. O conteúdo das placas de cultura foi centrifugado por 10 minutos (700 x g) e o sobrenadante separado para dosagem do IFN- $\gamma$  pelo teste imunoenzimático comercial Bovigam (CSL LTDA.), usado de acordo com as especificações do fabricante.

A reação foi lida em leitor de ELISA (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) no comprimento de onda de 450 nm.

Os resultados de densidade óptica (DO) foram convertidos em índices de IFN- $\gamma$  (PAULE, 2003), usando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de IFN-}\gamma = \frac{\text{DO amostra} - \text{DO controle negativo}}{\text{DO controle positivo} - \text{DO controle negativo}}$$

O ponto de corte foi definido através da curva ROC (curva operacional relativa). Esta análise se baseia numa curva onde são colocados os valores de corte, tendo no eixo das ordenadas a sensibilidade e no eixo das abscisas a taxa de falso positivo (ou seja, 1 menos o valor da especificidade). O ponto de corte ideal é o que permite uma especificidade, sem perda de sensibilidade (KABA,2001). Os cálculos da sensibilidade e especificidade foram feitos usando-se os resultados do ELISA obtidos a partir dos 87 soros testados,

tendo como padrão ouro o isolamento de *C. pseudotuberculosis* na lesão caseosa, de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Positivo verdadeiro}}{\text{Positivo verdadeiro} + \text{falso negativo}}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Negativo verdadeiro}}{\text{Falso positivo} + \text{negativo verdadeiro}}$$

Os valores preditivos positivos e negativos foram de acordo com as fórmulas:

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{Positivo verdadeiro}}{\text{Positivo verdadeiro} + \text{falso positivo}}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{Negativo verdadeiro}}{\text{Falso negativo} + \text{negativos verdadeiro}}$$

A análise estatística foi realizada por métodos não paramétricos de Kruskal – Wallis para a comparação das médias de densidade óptica nas diferentes coletas para comparar os grupos experimentais, com um nível de significância de 95%.



## RESULTADOS

Os resultados de dosagem de IFN- $\gamma$  dos 30 animais são apresentados a seguir: Os animais dos Grupos I e III apresentaram edema nos locais de inoculação, sendo que a inflamação durou aproximadamente oito dias. Outra cabra (G III) apresentou um granuloma no linfonodo submandibular, se desenvolveu e rompeu-se liberando material purulento, enquanto uma do grupo IV apresentou um pequeno granuloma no linfonodo inguinal esquerdo.

A Figura 1 demonstra as médias do índice de produção de IFN- $\gamma$  liberado pelo estímulo do PBS nos dias das coletas, e entre os grupos experimentais, que não apresentam diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os grupos sob o estímulo do PBS e o grupo controle, que de um modo geral ficaram abaixo das médias do grupo controle, elevando-se na 5<sup>a</sup> e na 6<sup>a</sup> coletas.

A análise da resposta imune do antígeno secretado *C. pseudotuberculosis* na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 2) demonstra diferença ( $p < 0,05$ ) ao estímulo antigênico nos dias das coletas entre todos os grupos, com exceção do grupo não infectado (controle).

Do mesmo modo, verifica-se (Figura 3) que houve diferença ( $p < 0,05$ ) com o uso do mitógeno PWM, na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , que apresentou resultados distintos considerando que induziu maior produção de IFN- $\gamma$  entre as coletas de todos os grupos.

No perfil do índice de produção de IFN- $\gamma$ , permite-se identificar que a resposta imune (Figura 2), observada nos gráficos 1, 2 e 3, apresenta uma resposta de curta duração, cinco dias após a infecção, para os animais dos grupos I, III e V e uma outra resposta de média duração que teve início por volta do 9º dia com seu pico máximo no 16º dia após infecção observada nos grupos II e III. O grupo dos animais controle não exibiu nenhuma resposta com índice de produção de IFN- $\gamma$  após inoculação com solução salina.

A comparação das médias dos índices de produção do IFN- $\gamma$  entre as coletas dos diversos grupos experimentais, através da correlação dessas variáveis, apresentou um comportamento semelhante, com uma média positiva baixa entre PBS e PWM ( $r = 0,3$ ) e médias altas positivas com diferenças ( $p < 0,05$ ) para PBS e Antígeno ( $r = 0,6$ ) e Antígeno e PWM ( $r = 0,5$ ).

Tabela 2 – Índice de estimulação de células do sangue total de caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*, sob efeito dos hormônios da reprodução em resposta a Antígeno secretado; Mitógeno (PWM) e PBS. Os dados representam médias do índice de produção da cultura celular após 24 horas nas diferentes coletas dos grupos experimentais.

Coletas		Média dos Grupos						Controle		
		I	II	III	IV	V	VI	Positivo	Negativo	Branco
1ª (dia 0)	PBS	0,097 <sup>a</sup>	0,090 <sup>a</sup>	0,106 <sup>a</sup>	0,097 <sup>a</sup>	0,087 <sup>a</sup>	0,105 <sup>a</sup>	-	-	-
	PWM	0,576 <sup>a</sup>	0,468 <sup>a</sup>	0,635 <sup>a</sup>	0,464 <sup>a</sup>	0,588 <sup>a</sup>	0,510 <sup>b</sup>	2,228	0,087	0,083
	AG	0,175 <sup>a</sup>	0,120 <sup>a</sup>	0,107 <sup>a</sup>	0,172 <sup>a</sup>	0,109 <sup>a</sup>	0,112 <sup>b</sup>	2,15	0,084	-
2ª (dia 5)	PBS	0,281 <sup>a</sup>	0,104 <sup>a</sup>	0,103 <sup>a</sup>	0,103 <sup>a</sup>	0,090 <sup>a</sup>	0,123	-	-	-
	PWM	1,106 <sup>a</sup>	0,778 <sup>a</sup>	0,409 <sup>a</sup>	1,021 <sup>a</sup>	0,978 <sup>a</sup>	0,725 <sup>b</sup>	2,004	0,086	0,077
	AG	0,292 <sup>a</sup>	0,342 <sup>a</sup>	0,116 <sup>a</sup>	0,407 <sup>a</sup>	0,246 <sup>a</sup>	0,157 <sup>b</sup>	2,002	0,085	-
3ª (dia 9)	PBS	0,224 <sup>a</sup>	0,093 <sup>a</sup>	0,103 <sup>a</sup>	0,095 <sup>a</sup>	0,087 <sup>a</sup>	0,118 <sup>a</sup>	-	-	-
	PWM	0,592 <sup>a</sup>	0,447 <sup>a</sup>	0,412 <sup>a</sup>	0,467 <sup>a</sup>	0,526 <sup>a</sup>	0,500 <sup>b</sup>	1,441	0,085	0,075
	AG	0,222 <sup>a</sup>	0,142 <sup>a</sup>	0,105 <sup>a</sup>	0,110 <sup>a</sup>	0,154 <sup>a</sup>	0,120 <sup>b</sup>	1,521	0,094	-
4ª (dia 13)	PBS	0,178 <sup>a</sup>	0,094 <sup>a</sup>	0,110 <sup>a</sup>	0,104 <sup>a</sup>	0,090 <sup>a</sup>	0,117 <sup>a</sup>	-	-	-
	PWM	0,832 <sup>a</sup>	0,491 <sup>a</sup>	0,706 <sup>a</sup>	0,558 <sup>a</sup>	0,584 <sup>a</sup>	0,591 <sup>b</sup>	1,305	0,091	0,088
	AG	0,233 <sup>a</sup>	0,140 <sup>a</sup>	0,118 <sup>a</sup>	0,131 <sup>a</sup>	0,132 <sup>a</sup>	0,110 <sup>b</sup>	1,585	0,096	-
5ª (dia 16)	PBS	0,112 <sup>a</sup>	0,120 <sup>a</sup>	0,213 <sup>a</sup>	0,139 <sup>a</sup>	0,113 <sup>a</sup>	0,143 <sup>a</sup>	-	-	-
	PWM	1,255 <sup>a</sup>	0,752 <sup>a</sup>	1,064 <sup>a</sup>	0,848 <sup>a</sup>	0,935 <sup>a</sup>	0,912 <sup>b</sup>	2,525	0,088	0,084
	AG	0,370	0,155	0,226	0,146	0,190	0,156 <sup>b</sup>	2,587	0,093	-
6ª (dia 21)	PBS	0,209 <sup>a</sup>	0,223 <sup>a</sup>	0,251 <sup>a</sup>	0,200 <sup>a</sup>	0,219 <sup>a</sup>	0,270 <sup>a</sup>	-	-	-
	PWM	0,851 <sup>a</sup>	0,663 <sup>a</sup>	0,746 <sup>a</sup>	0,862 <sup>a</sup>	0,768 <sup>a</sup>	0,646 <sup>b</sup>	1,931	0,086	0,081
	AG	0,411 <sup>a</sup>	0,253 <sup>a</sup>	0,274 <sup>a</sup>	0,390 <sup>a</sup>	0,248 <sup>a</sup>	0,108 <sup>b</sup>	1,908	0,088	-

Letras subscritas diferentes em linha denotam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os diversos grupos experimentais.

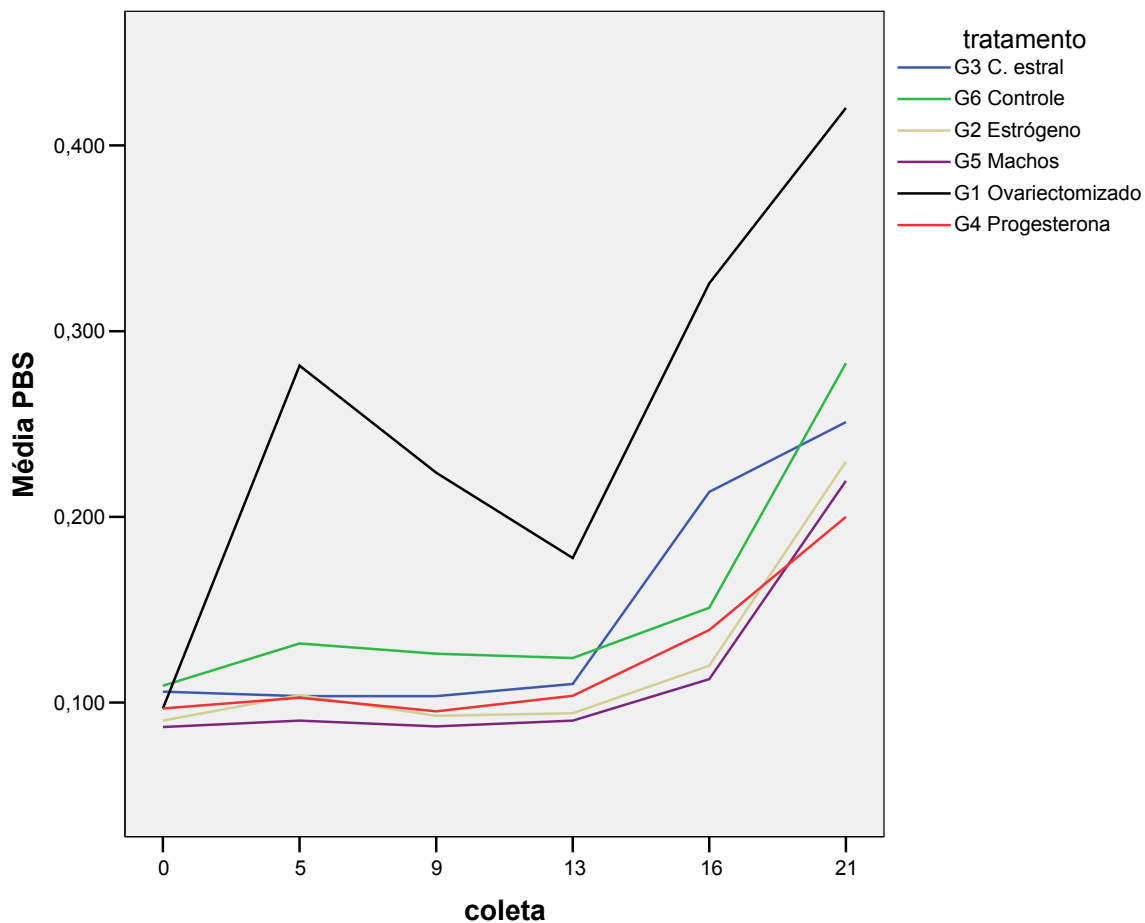


GRAFICO 1. Perfil do índice de produção de IFN- $\gamma$  de células de sangue total caprino infectado experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, sob efeito dos hormônios da reprodução, em resposta à estimulação por PBS. Os dados representam média de densidade óptica dos dias de coletas dos grupos experimentais de cultura celular após 24 horas.

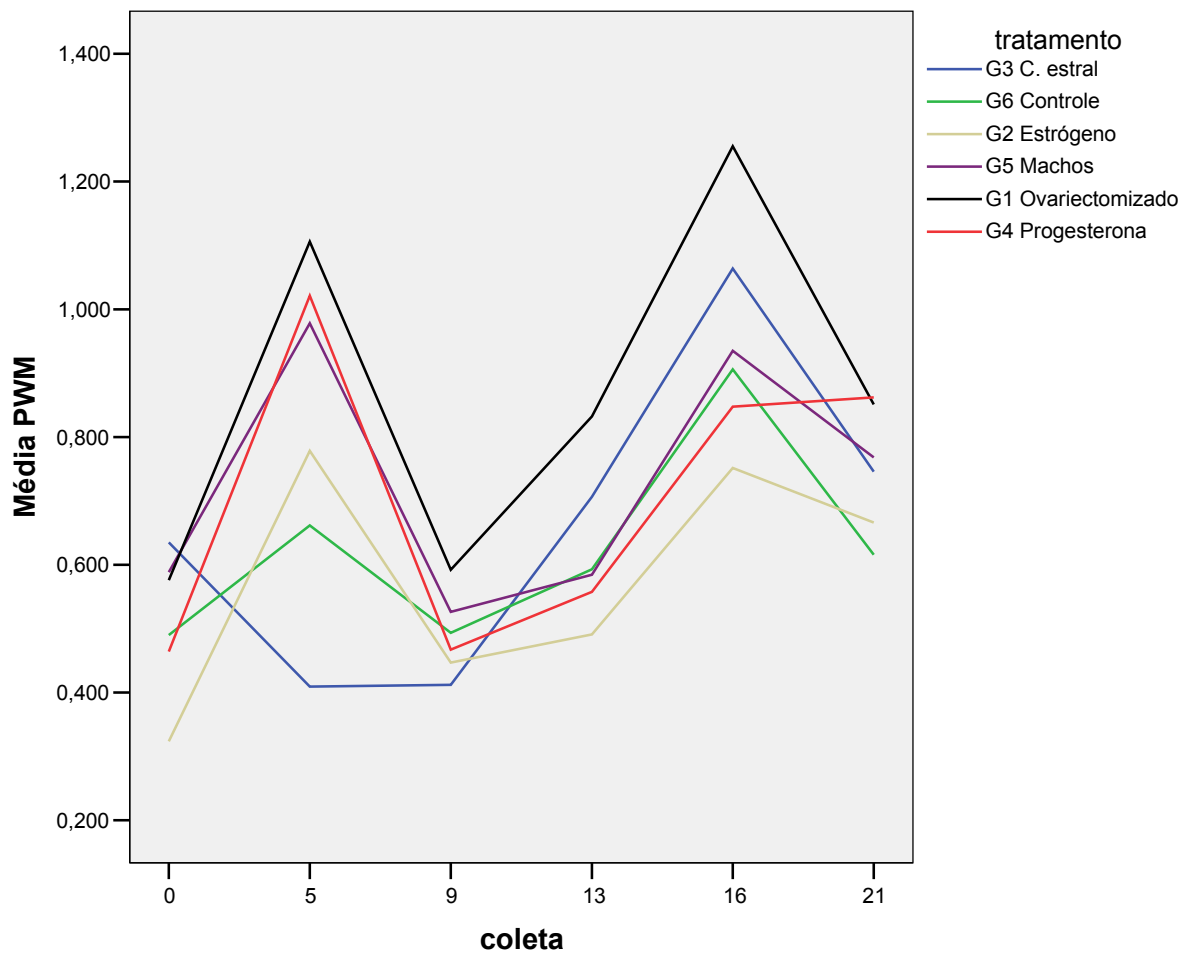


GRAFICO 2. Perfil do índice de produção de IFN -  $\gamma$  de células de sangue total caprino infectado experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, sob efeito dos hormônios da reprodução, em resposta à estimulação por mitógeno (PWM). Os dados representam média de densidade óptica dos dias de coletas dos grupos experimentais de cultura celular após 24 horas.

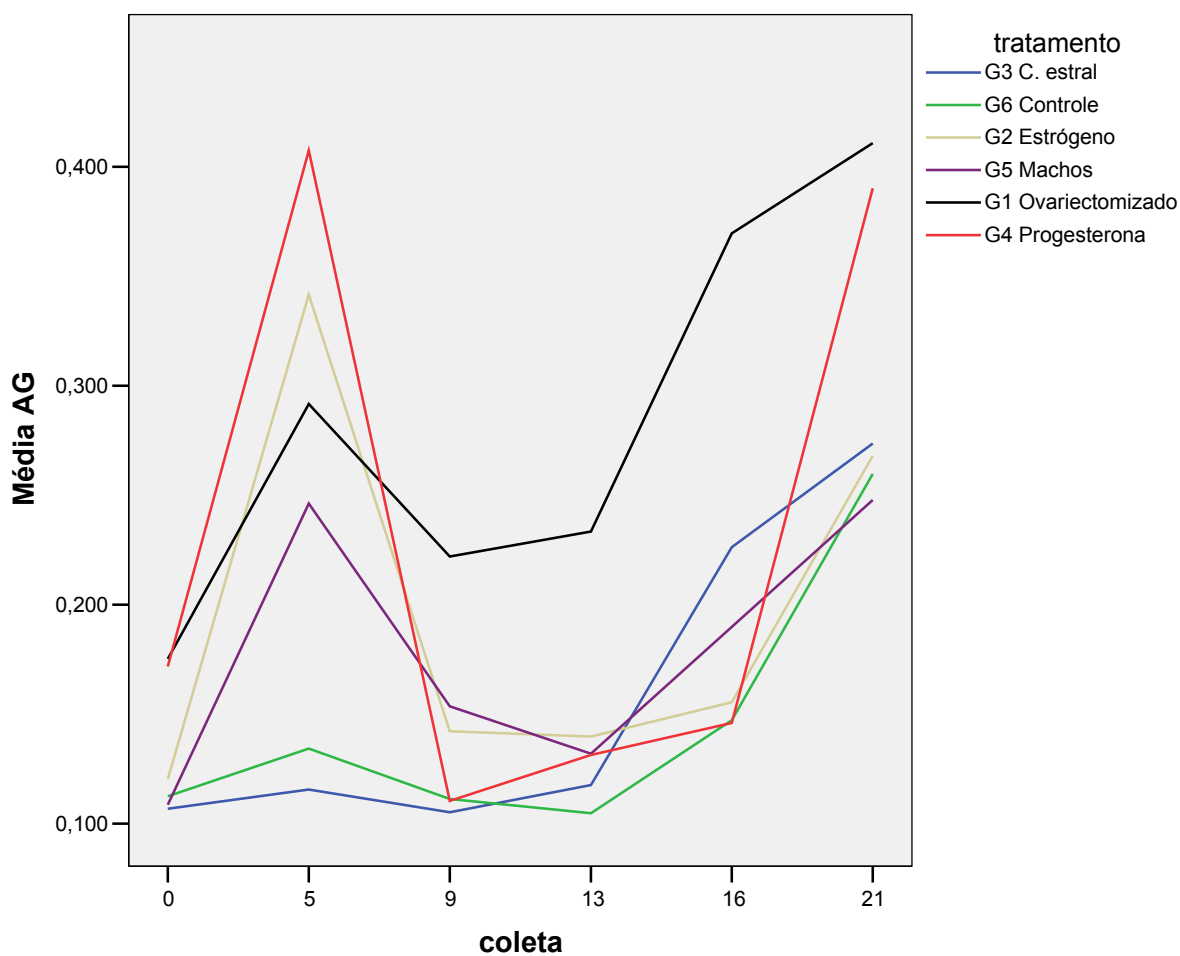


GRAFICO 3. Perfil do índice de produção de IFN -  $\gamma$  de células de sangue total caprino infectado experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, sob efeito dos hormônios da reprodução, em resposta à estimulação por antígeno secretado. Os dados representam média de densidade óptica dos dias de coletas dos grupos experimentais de cultura celular após 24 horas.

## DISCUSSÃO

A resposta imunológica frente ao desafio com o antígeno foi do tipo Th1, medida pela produção de IFN- $\gamma$  por células do sangue total, e constatou-se que o quadro clínico apresentado pelos animais não foi tão severo como descrito por PRESCOTT (2002), onde, a necropsia demonstrou baixa intensidade de infecção, coincidindo com os resultados de PAULE (2003). Considerando que o teste imunoenzimático é proveniente de uma reação cruzada do anticorpo monoclonal para IFN- $\gamma$  bovino com o IFN- $\gamma$  específico caprino, essa detecção adaptada apresentou uma resposta bem caracterizada da produção do IFN- $\gamma$ , dados esses que concordam com os apresentados por PRESCOTT (2002), que, trabalhando com ovelhas, afirmou que o kit para detecção de IFN- $\gamma$  bovino nessa espécie mostrou-se de boa confiabilidade para detectar a linfadenite caseosa em pequenos ruminantes. Resultados semelhantes foram relatados por PAULE (2003). Pode-se afirmar ainda que a infecção experimental com uma cepa selvagem foi eficiente para demonstrar a resposta imune da linfadenite em caprinos. Esses achados estão de acordo com dados reportados por REGIS (2001), que não demonstrou estimulação significativa na produção de IFN- $\gamma$  quando utilizou antígeno secretado. Dados semelhantes foram encontrados no presente estudo que induziu uma baixa intensidade de resposta na produção de IFN- $\gamma$  nos vários grupos experimentais testados. Foi possível identificar animais com baixa ou média respostas ao estímulo antigênico. Acredita-se que existem concentrações seletivas de células Th1 no sítio da doença em indivíduos com resposta imune de resistência, o que sugere que essas células possuem um papel importante na defesa contra o microorganismo.

O pico de produção de IFN- $\gamma$  ocorrido no 5º dia após infecção sugere confirmação de que a resposta dos tratamentos experimentais poderá ser interpretada como uma estimulação antigênica, revelando uma resposta primária nos grupos que receberam tratamentos, evidenciando a fase inicial da infecção que consiste na resistência à fagocitose e à digestão lisossomal que, por sua vez, são mecanismos de escape desse tipo de agente que levam à formação de lesões crônicas ou reincidivantes, concordando com ABBAS (2000), que ressaltou também a importância dos neutrófilos e macrófagos na infecção inicial, dados que foram constatados no experimento e também demonstrados por JOLLY (1966). Uma segunda resposta foi identificada com um ligeiro aumento do índice de IFN- $\gamma$  no 16º dia pós-infecção, com índices máximos obtidos pelo grupo I, o que não foi observado no grupo controle, correspondendo obviamente, com uma segunda fase de resposta imune de amplificação ao estímulo da célula, coincidindo com as afirmações de MUNRO (1989). Ficou, portanto, demonstrado não haver influência no índice de produção de IFN- $\gamma$  nos grupos experimentais tratados com hormônios da reprodução.



## **CONCLUSÕES**

Os resultados do estudo permitem concluir que:

Os hormônios da reprodução não demonstraram ter influência sobre a resposta imune na produção do IFN- $\gamma$  por células de sangue total *in vitro* em caprinos.

O perfil de produção de IFN- $\gamma$  induzido pela estimulação antigênica apresentado pelos grupos experimentais caracterizou a resposta imune em duas fases distintas de tempo após a infecção, a das respostas primárias e a das secundárias.

Os resultados demonstraram que o antígeno secretado usado no experimento induziram baixa intensidade na produção de IFN- $\gamma$  nos grupos experimentais testados.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABBAS, J. K.; LICHTMAN, A. H.; PODER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 2000.

AYERS, J. L. Caseous lymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA**, Schaumburg, v. 171, p. 1251-1254, 1977.

AZAB, E. M.; ABDEL-MAKSOUND, H. A. Changes in some hematological and biochemical parameters during prepartum and postpartum periods in female Baladi goats. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 77-85, 1999.

BARIL, G. Possibilidades atuais da transferência de embriões em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, 1995. **Anais...** Belo Horizonte, 1992.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v. 63, p. 269-272. 1986.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. **Commonw. Bur. An. Health**, London, v. 32, p. 645-657, 1962.

BERCZI, I. The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology. In: \_\_\_\_\_; GZERMELY, P. Stress of life: from molecules to man. **NYAS**, Berlim, v. 851, p. 3-12, 1998.

BOEHM, U. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . **Annu Rev Immunol**, California, n. 15, p. 749-795, 1997.

CAMERON, C. M.; MINNAR, J. L.; PURDON, M. R. Immunizing properties of *Corynebacterium pseudotuberculosis* cell walls. Onderstepoort. **J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 36, n. 2, p. 211-216, 1969.

CAMPBELL, S. G., ASHFAQ, M. K. J. J. Caseous lymphadenitis in goats in the USA. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, Tucson, 1982. **Proceedings...** Tucson, 1982.

FORTAGNE, M.; SCHAFER, M. Hamatologische parameter der probstheidaer kleinziege in abhangigkeit von graviditat laktation. **Arch. Exp. Veterinarmed.** Berlin, v. 43, p. 223-230, mar., 1989.

JOLLY, R. D. Some observations on surface lipos of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. **J. Appl. Bact.**, Oxford, v. 29, n.1, p. 189-196, 1966.

LIO, D. Genotype frequencies of the +874T: a single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- $\gamma$  gene in a sample of sicilian patients affected by tuberculosis. **Europ J Immunogenet.**, Weinheim, n. 29, p. 371-374, 2002.

MARQUES JÚNIOR, A. P.; SILVA, T. M. F.; BATISTA, R. A. Hemograma de cabras leiteiras nos períodos pré e pós-parto, mantidas em confinamento. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 42(3), p. 187-195, 1990.

MBASSA, G. K.; POULSEN, J. S. D. Influence of pregnancy, lactacion and environment to haematology profiles in Danish Landrace dairy goats (*Capra hircus*) of different parity. **Comp. Biochem. Physiol. – B.**, New York, v. 100, n. 2, p. 403-412, 1991.

MOURA COSTA, L. F. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2002.

MUNRO, J. M.; PODER, J. S.; COTRAN, R. S. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endotelial activation and associated leucocyte accumulation in skin of paio anubis. **Am. J. Path.**, Champaignius, n. 135, p. 121-131, 1989.

NAIRN, M. E. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3. 1982. **Proceedings...** Tucson, 1982.

PAULE, B. J. A. et al Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetcs of pseudotuberculosis primary infection in goats: kinetcs of `IgG and interferon- production, IgG avidity and antigen recognition by western blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 96, p. 128-139, 2003.

PETROVSKY, N. Toward a unified model of neuroendocrine-immune interaction. **Immunology & Cell Biology**, Adelaide, v. 79, n. 4, p. 350-357, 2001.

PRAVICA, V. et al. In vitro production of IFN- $\gamma$  correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- $\gamma$  gene. **Europ J Immunogenetics**, Oxford, n. 26, p. 1-3, 1999.

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

REGIS, L. F. et al. Effect of different lectins on the proliferation of goat peripheral blood mononuclear cells. **Small Rumin**, Baltimore, v. 46, p. 71-73, 2002.

\_\_\_\_\_. Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

REMY, J. B. et al. Area antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle stimulating hormone? **Theriogenology**, New York, v. 36, p. 389-399, 1991.

RIBEIRO, C. et al. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, n. 8, p. 27-29, 1988.

ROY, A.; SAHNI, K. L.; DATTA, I. C. Studies on certain aspects of sheep and goat husbandry: VII Variations in blood corpuscles of sheep and goat

during different seasons, pregnancy, parturition and post-parturition period. **Indian J. Vet. Sci.**, New Delli, v. 35, n. 1, p. 24-32, 1965.

SAS INSTITUTE. **SAS**, Cary, v. 9, 2000. CD-ROM.

SHRIKANT, P.; BENVENISTE, E. N. The central nervous systems as an immunocompetent organ. **J. Immunol**, Baltimore, v. 157, p. 1819-1822, 1996.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: Actions and mechanisms of action. **Physiol. Vet**, New York, v. 79, p. 1-71, 1999.

VERMA, A. K.; PANDIT, R. K.; NEMA, S. P. Certain observations on parturition process in local goats. **Indian Vet. J. Sci.**, New Delli, v. 67, n. 4, p. 376-377, 1990.

VIANA, R. B. et al. Influência da gestação e do puerpério sobre o leucograma de caprinos da raça Saanen, criados no Estado de São Paulo. **BRAZ, J. Vet. Res. Anim. Sci**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 196-201, 2002.

VIHAM, V. A.; RAI, P. Certain hematological and biochemical attributes during pregnancy, parturition and post-parturition periods in sheep and goats. **Indian J. Anim. Sci.**, New Delli, v. 57, n. 11, p. 1200-1204, 1987.

## 5.0 DISCUSSÃO GERAL

Considerando a evolução tecnológica ocorrida no último século, têm sido utilizados novos conhecimentos nas biotécnicas da reprodução em caprinos. Contudo, a alta prevalência de linfadenite caseosa nos rebanhos de caprinos e ovinos ainda permanece causando baixa eficiência reprodutiva, como subfertilidade e menor número de crias por parto, resultando em importantes perdas econômicas para os criadores. Diante dessas ponderações, com o intuito de esclarecer e de determinar possíveis alterações imunológicas, o presente estudo propõe avaliar a resposta imune humoral e celular em caprinos infectados experimentalmente por *C. pseudotuberculosis* sob o efeito dos hormônios da reprodução.

BERCZI (1998) e PETROVSKY (2001) ressaltam que a resposta imune é fruto da interação entre linfócitos T (LT), linfócitos B (LB) e monócitos/macrófagos. Essa interação conduz a proliferação celular, produção de anticorpos, diferenciação de células citotóxicas, o aumento da atividade microbicida e a diferenciação hematopoiética. Entretanto, para BERCZI (1988), a regulação dessa complexa rede de respostas imunológicas e inflamatórias depende principalmente da comunicação entre as células que participam, interagindo-se, nos mecanismos recíprocos entre o sistema imune e o neuroendócrino, que é mais evidente no aumento de secreções hipotálamo-pituitárias, em função de processos que alteram a homeostase do organismo, como estresse, inflamação e infecção. Já SCHRIKANT; BENNESISTE (1996) e TURNBULL; RIVIER (1999) acreditam que as alterações da função imune, após estimulação neuroendócrina, sugerem que a imunocompetência pode ser regulada pelo sistema nervoso central, via diversas moléculas mensageiras chamadas de neurotransmissores, citocinas

ou hormônios. PETROVSKY (2001) afirma que a produção de citocinas está sob controle neurohormonal, o que é possível porque leucócitos expressam receptores opióides, adrenérgicos e colinérgicos. Isso significa que o sistema imune e outros sistemas são mutuamente dependentes. A adequada distribuição dos leucócitos nos diversos compartimentos corpóreos é fundamental para a manutenção da homeostase no funcionamento do sistema imune. O sangue é um importante compartimento, no qual as células imunes podem trafegar entre os tecidos. Alterações na distribuição dos leucócitos pode influenciar significativamente na resposta imune a diferentes estímulos e desafios.

Embora praticamente todos os tipos de leucócitos contribuam para a defesa do hospedeiro, três tipos desempenham papéis particularmente importantes. Os linfócitos possuem pouca capacidade fagocítica, mas realiza uma série de outras reações protetoras, coletivamente conhecidas como respostas imunológicas. Os monócitos-macrófagos e neutrófilos são células potencialmente fagocíticas, importantes na imunidade inata. Essas afirmações estão de acordo com STROBER e FUSS (2000). A resposta imune inespecífica é mediada por um conjunto de células, as *natural Killer* (NK), monócitos-macrófagos e neutrófilos, os quais usam sistemas de reconhecimento não específicos para neutralizar e destruir microorganismos. Células imunes e leucócitos circulam continuamente do sangue para vários órgãos e vice-versa. Essa circulação é essencial para a manutenção de uma efetiva rede de defesa imunológica. O número e a proporção de leucócitos no sangue circulante fornecem uma importante representação sobre a distribuição dos leucócitos e o estado de ativação do sistema imune. O presente estudo demonstrou que há relação com o trabalho de DREAU (1999) e outros autores, quando afirmaram



que o estresse e hormônios induzem trocas significativas no número absoluto e relativo de leucócitos no sangue.

As alterações no número de leucócitos circulantes observadas neste estudo sugerem efeito do estresse agudo, representado pela infecção experimental. Autores demonstraram alterações no tráfego de leucócitos sanguíneos durante condições estressantes diversas, através da recirculação dessas células dos compartimentos periféricos (linfonodos, baço e outros tecidos) para os compartimentos centrais (sangue periférico). O estímulo estressante estaria recrutando células no sentido de aumentar a vigilância inespecífica sobre o organismo suscetível, preparando-o para se defender de possíveis ameaças. Tais afirmações concordam com DHABHAR (1999; 2000) e STEFANSKI (2000).

Como o sistema imune é altamente responsivo ao estresse agudo, a resposta é desencadeada principalmente pela ativação do eixo HPA, o qual estrutura e direciona uma resposta fisiológica ao estresse. Acredita-se ainda que a rapidez da redistribuição dos leucócitos nos tecidos linfóides para sangue periférico seja regulada também pela ação do sistema nervoso simpático, principalmente através de receptores beta-adrenérgicos na superfície dessas células, o que está de acordo com MILLS (1995).

O teste de correlação de *Spearman* mostrou um alto grau de correlação entre leucócitos totais e granulócitos tanto para os grupos quanto para as coletas, demonstrando que o aumento do número de leucócitos circulantes ocorreu, principalmente, por um aumento no número de granulócitos, representados principalmente pelos neutrófilos.

Diante da ausência de referência sobre possíveis influências imunológicas durante as várias fases reprodutivas nos caprinos para se compararem os resultados relacionados ao número total de leucócitos obtidos, recorreu-se aos resultados dos grupos de animais não gestantes e na sua fase inicial de gestação, citados por BIRGEL (1969), FERREIRA NETO (1982; 1986), MATOS (1982), MARQUES JÚNIOR (1983), UNANIAN (1986), VERMA (1990) E BARROS FILHO (1997). Verificou-se uma discordância nos valores das médias neste trabalho para o número de leucócitos, os quais foram inferiores aos já descritos na literatura acima mencionada, porém deve-se ressaltar que as alterações fisiológicas hormonais, ocorridas durante o período inicial da gestação diferem das ocorridas durante o período dos procedimentos experimentais, o que está em acordo com MARGNI e MALAN-BOREL (1996) e KRAJNICA KOVA (1995) quanto à afirmação de que tanto a progesterona quanto o estrógeno deprimem *in vitro* e *in vivo* as reações imunológicas, demonstrando assim uma cinética leucocitária na fisiologia dos caprinos. Considerando tudo isso, demonstrou-se uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no número total de leucócitos obtido no Grupo V (animais machos), a partir do dia 0 até o 16º dia, que foi mais elevado do que o número de leucócitos dos demais grupos experimentais. Esse fato chamou a atenção, o que leva a se pensar que o hormônio masculino influencia a resposta imunológica, na espécie caprina.

Observando todos os grupos experimentais, é possível identificar um aumento do número de leucócitos totais no 5º dia após inoculação da cepa infectante, caracterizando uma resposta imunológica inata. Foi observado um discreto quadro leucocitário predominantemente neutrofílico a partir do 5º dia de experimento, com diferenças ( $p > 0,05$ ) dos grupos I, II, IV e V com o grupo controle, fato esse que está em concordância com aqueles citados na literatura

para caprinos adultos (BIRGEL, 1969; BARROS FILHO 1997), o que não foi observado nos dias 10° e 13° no Grupo III. Todavia, os resultados do presente estudo estão em discordância com aqueles descritos por ROY (1965), FORTALGNE; CHAFER (1989) e AZAB; ABDEL-MAKSOUND (1989); que não verificaram influência da gestação sobre o número de linfócitos. No entanto, o presente estudo apresentou média do número de linfócitos durante o experimento abaixo dos valores normais da espécie com diferença ( $p < 0,05$ ) nos grupos III e V nos dias 10° e 13°, nos grupos III e VI no dia 16°, e nos grupos I e VI com os demais grupos experimentais. O que se pode justificar com a afirmação de DHABHAR (1995; 1997) é que o estresse agudo resulta numa diminuição rápida e significativa do número e percentual relativo de linfócitos e monócitos no sangue circulante de ratos normais. A análise dos resultados identificou que o número absoluto de eosinófilos diminuiu, apresentando uma diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais e o controle. Já os monócitos apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) apenas nos dias 5° a 10° após a infecção entre os grupos experimentais e o controle, coincidindo com uma resposta inata frente à cepa infectante, o que está de acordo com JOLLY (1965a) e HARD (1969), que afirmam ser o primeiro estágio pós-infecção tendo os neutrófilos e macrófagos como as principais células envolvidas na resposta contra *C. pseudotuberculosis*. A presença desses tipos celulares foi demonstrada como crítica no estabelecimento de uma resposta protetora da infecção primária e também secundária por LAN (1999). Entretanto, a imunidade inata na circulação materna durante a gestação humana foi abordada por SACKS (1999), que descreveu um aumento no número de monócitos e na sua capacidade fagocitária.

Os basófilos não apresentaram alteração dos valores normais da espécie. Entretanto, FORTÜGNE; SCHAFER (1989), MARQUES JÚNIOR (1990),

VERMA (1990), MBASSA; POULSEN (1991) e AZAB; ABDEL-MAKSOUUD (1990) não fizeram referências a uma possível influência sobre o número de eosinófilos e basófilos, tendo em vista a escassez de estudos com referência sobre possíveis influências do número de basófilos. Recomenda-se que outros estudos sejam realizados para esclarecer, em definitivo, a influência nas fases reprodutivas dos caprinos sobre o quadro leucocitário.

Esse estudo também foi realizado com o intuito de verificar possíveis influências da resposta imune celular sobre a cinética da produção de IFN- $\gamma$  em caprinos, experimentalmente infectadas com *C. pseudotuberculosis*, sob o efeito dos hormônios progesterona; estrógeno e hormônios masculinos. Ressaltamos que a resposta imunológica apresentada frente ao desafio com o antígeno foi do tipo Th1, mediada pela produção de IFN- $\gamma$  por células do sangue total. Considerando que o teste é proveniente de uma reação cruzada do anticorpo monoclonal para IFN- $\gamma$  bovino com o IFN- $\gamma$  específico caprino, essa detecção adaptada apresentou uma resposta bem caracterizada da produção do IFN- $\gamma$ , dados em que concordamos com PRESCOTT (2002) que, trabalhando com ovelhas, afirmou que o *kit* para detecção de IFN- $\gamma$  bovino mostrou-se de boa confiabilidade para detectar a linfadenite caseosa em cabras. Resultados semelhantes foram relatados por PAULE (2003). Pode-se afirmar ainda que a infecção experimental com uma cepa selvagem foi eficiente para demonstrar a resposta imune da linfadenite em caprinos. Esses achados estão de acordo com dados reportados por REGIS (2001), que não demonstrou estimulação significativa na produção de IFN- $\gamma$  quando utilizou antígeno somático. Dados semelhantes foram encontrados com o uso do antígeno secretado no presente experimento que induziu mediana intensidade na produção de IFN- $\gamma$  nos vários grupos experimentais testados. Foi possível identificar, de maneira não esperada, animais com baixa ou média e alta

resposta ao estímulo. Acreditamos que existem concentrações seletivas de células Th1 no sítio da doença em indivíduos com resposta imune de resistência, sugerindo que essas células possuem um papel importante na defesa contra o microorganismo.

O pico do índice de IFN- $\gamma$ , no 5º dia após infecção, veio confirmar que a resposta dos tratamentos experimentais poderá ser interpretada como uma estimulação antigênica, revelando uma resposta inata nos grupos que receberam tratamentos, evidenciando a fase inicial da infecção que consiste na resistência à fagocitose e à digestão lisossomal que, por sua vez, é mecanismo de escape desse tipo de agente, que leva à formação de lesões crônicas ou reincidivantes, conforme ABBAS (2000) que ressaltou também a importância dos neutrófilos e macrófagos na infecção inicial, dados que foram constatados no experimento e também demonstrados por JOLLY (1965). O que não foi observado no grupo controle pôde-se observar nos grupos II e III. Uma segunda resposta foi identificada com um ligeiro aumento do índice de IFN- $\gamma$ , que ocorreu no 16º dia após infecção, com índices máximos, o que corresponde a uma fase de resposta imune de amplificação, concordando com as afirmações de MUNRO (1986). A formação do piogranuloma envolvendo maior número de macrófagos e linfócitos, fase em que o IFN- $\gamma$  possui a capacidade de modular a migração celular, atua sobre a expressão de moléculas de superfície celular que são muito importantes nesse processo. Onde se esperava uma resposta imune amplificada pelos hormônios, por células ativadas, esse fato não ocorreu e ficou demonstrado não haver influência no índice de produção de IFN- $\gamma$  nos grupos experimentais tratados com hormônios da reprodução. A avaliação da resposta dos anticorpos totais IgG total e IgG específico anti *C. pseudotuberculosis* em razão do antígeno microbacteriano é influenciada quando o animal é submetido à ação hormonal

durante os procedimentos das biotécnicas da reprodução. O curso divergente da doença decorre de grau e/ou mecanismos distintos da imunidade celular. As citocinas são as responsáveis centrais pela regulação da resposta celular e também controlam a produção de distintas subclasses de imunoglobulinas. A nossa hipótese era, assim, que, avaliando a presença dos anticorpos totais IgG total e IgG específico contra o antígeno *C. pseudotuberculosis*, poderíamos obter informação sobre a resposta imune humoral presente nos animais sob a ação hormonal e identificar possíveis influências hormonais.

## 6.0 CONCLUSÕES

A interpretação dos resultados obtidos na avaliação da influência dos hormônios da reprodução sobre a resposta imunológica de caprinos infectados experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, detalhados nos artigos apresentados, possibilitaram as seguintes conclusões:

Podemos ressaltar que as alterações fisiológicas causadas pelos hormônios nas fêmeas levaram a uma redução do número total de leucócitos que ficaram abaixo da média normal da espécie. Com isso podemos concluir que os hormônios progesterona e estrógeno deprimem a resposta imune nos caprinos infectados com *C. pseudotuberculosis* compatível com um quadro de estresse, que pode levar à degeneração dos ovócitos nas fêmeas.

Constatou-se que, no grupo composto por animais masculinos, houve um aumento do número total dos leucócitos, comprovando que o hormônio

masculino determina influência na resposta imunológica sobre o quadro leucocitário dos caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis*.

A resposta imune humoral do anticorpo IgG demonstrou a existência de uma correlação mais alta com IgG anti *C. pseudobuberculosis*, provavelmente em decorrência da produção de IFN- $\gamma$  em níveis suficientes para influenciar na formação de subclasses das imunoglobulinas.

O padrão de resposta de imunoglobulinas apresentado contra antígeno definido permite conclusões amplas sobre o mecanismo imunorregulador. Contudo, não permite uma definição precisa do fenômeno, mas podemos afirmar que os hormônios femininos determinaram influência na resposta imune humoral.

Os hormônios da reprodução não demonstraram ter influência sobre a resposta imune na produção do IFN- $\gamma$  por células de sangue total *in vitro* em caprinos experimentalmente infectados por *C. pseudobuberculosis* sob efeito dos hormônios da reprodução.

O perfil do índice de produção de IFN- $\gamma$ , induzido pela estimulação antigênica, apresentado pelos grupos experimentais, caracterizou a resposta imune em duas fases distintas de tempo após a infecção.

Os resultados demonstraram que o antígeno secretado usado no experimento induziu baixa intensidade na produção de IFN- $\gamma$  nos grupos experimentais testados.

Considerando que o teste imunoenzimático *Bovigan* é proveniente de uma reação cruzada de anticorpo monoclonal para IFN- $\gamma$  bovino com IFN- $\gamma$  específico caprino, demonstrou-se ter valor na detecção da linfadenite caprina, podendo ser associado a programas de manejos zootécnicos e sanitários e tornar-se uma ferramenta eficiente no controle da linfadenite caprina.



## **7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, J. K.; LICHTMAN, A. H.; PODER, J. S. **Cellular and mollecular immunology**. 4. ed. Saunders Company, 2000.

ALVAREZ, E. Inmunologia de la reproducción. In: MARGNI, **Inmunologia e inmunoquímica: fundamentos**. 5. ed. Editorial Médica Panamericana, 1999.

AUGENER, W. et al. The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with Cl. **Immunochemistry**, n. 8, p. 1011-1020, 1971.

AYERS, J. L. Caseours Iymphadenitis in goat and sheep: review of diagnosis, pathogenesis, and immunity. **JAVMA**, v. 171, p. 1251-1254, 1977.

AZAB, E. M.; ABDEL-MAKSOUND, H. A . Changes in some hematological and biochemical parameters during prepartum and pospartum periods in female Baladi goats. **Small Rumin. Res.**, v. 34, n. 1, p. 77-85, 1999.

BARIL, G. Possibilidades aturais da transferência de embriões em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995. **Anais...** Belo Horizonte, 1992, p. 110-120.

BARIL, G. et al. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen gotas. **Zuchthygiene**, v. 24, p. 101-115, 1989.

BARROS FILHO, I. R. et al. Leucograma de cabras soropositivas para o vírus da artrite encefalite dos caprinos na região metropolitana de Curitiba-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, Gramado-RS, 1997. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997.

BATEY, R.G. Pathogenesis of caseous Lymphadenitis in sheep and goats. **Aust. Vet. J.**, v. 63, p. 269-272, 1986.

BATTYE, K. M.; FAIRCLOUGH, A. J.; CAMERON, A. W. N. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated many goat (*Capra hircus*). **J. Reprod. Fertil.**, v. 80, p. 425-430, 1988.

BENELLI, R. et al. Neutrophils as a key cellular target for angiostatin; implications for regulation of angiogenesis and inflammation. **FASEB J.**, v. 16, n.2, p. 267-269, 2002.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. Corynebacterium pseudotuberculosis and its role in diseases of animals. **Commonw. Bur. An. Health**, v. 32, p. 645-657, 1962.

BERCZI, I. The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology. In: \_\_\_\_\_. Czermely, P. Stress of life. From molecules to man. **NYAS**, v. 851, p. 3-12, 1998.

\_\_\_\_\_. Biochemical parameters during prepartum and postpartum periods in female Baladi goats. **Small Rumin. Res.**, v. 34, n. 1, p. 77-85, 1999.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. The Role of Cytokines in Immune Neuroendocrine interactions. In: BERCZI, I.; SZELENYI, J. (Ed.). **Adv. In Psychoneuroimmunol**, New York, v. 3, p. 149-160, 1994.

\_\_\_\_\_. Immune-neuro-endocrine circuits: integrative role of cytokines. In: GANONG, W. F.; MARTINI, L. (Ed). **Front. in Neuroendocrinol**. New York: Raven Press, 1992.

\_\_\_\_\_. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.

BIRGEL, E. H. **Estudo do quadro leucocitário de caprinos (*Capra hircus*, L.) normais, criados no Estado de São Paulo**: influência dos fatores raciais, sexuais, etários e alimentares. 1969. 113 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1969.

BIRGEL, E. H. Hematologia Veterinária. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982.

BOEHM, U. et al. Celular responses to interferon- $\gamma$ . **Annu Rev Immunol**, n. 15, p. 749-795, 1997.

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

BORQUE, C. et al. Progesterone levels in superovulated Murciana gotas with or without successful embryo collection. **Theriogenology**, v. 39, p. 192, 1993.

BROWN, C. C.; OLANDER, H. J.; ALVES, S. E. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brasil. **Can. J. Vet. Res**, v. 51, p. 46-49, 1987.

CAMERON, C. M. The immunogenicity of corynebacterium pseudotuberculosis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., Tucson, AR. **Proceedings...** Tucson, 1982.

CAMERON, C. M.; MINNAR, J. L.; PURDON, M. R. Immunizing properties of corynebacterium pseudotuberculosis cell walls. Onderstepoort. **J. Vet. Res.**, v. 36, n.2, p. 211-216, 1969.

CAMPBELL, S. G.; ASHFAQ, M. K. J. .J. Caseous lymphadenitis in goats in the USA. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., Tucson, AR. **Proceedings...** Tucson, 1982.

CARTWRIGHT, N. et al. A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN- $\gamma$  gene polymorphisms in normal individuals. **Transplantation**, n. 68, p. 1446-1552, 1999.

CHEMINAU, P. et al. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infect goat herd without bluetongue transmission. **Theriogenology**, v. 26, p. 279-290, 1986.

CHROUSOS, G. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immunemediated inflammation. **New Engl. J. Med.**, v. 332, n. 20, p. 1352-2362, 1995.

CONNOR, T. J.; LEONARD, B. E. Depression, stress and immunological activation: The role of cytokine in depressive disorders. **Life Sci.**, v. 62, n. 7, p. 583-606, 1998.

CORDOVA, A . S.; JIMENEZ, F.K.; HERNANDEZ, J.J.L. Serum progesterone concentration in goats superovulated with or ECG outside the breeding season. **Tec. Pec. México**, v. 30, p. 232-39, 1982.

COUSINS, D.V.; FRANCIS, R.; CASEY; MAYBERRY, C. Mycobacterium bovis infection in a goat. **Aust. Vet. J.** v. 70, p. 262-263, 1993.

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

DHABHAR, F. S. Acute stress enhances while chronic stress supresses immune function in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Braim Behav. Immun**, v. 11 p. 286-306, 1997.

\_\_\_\_\_. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leucocyte trafficking. **NYAS**, v. 917, p. 876-93, 2000.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Change in blood leucocyte distribution: interactions between catecholamine and glucocorticoid hormones. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, p. 213, 1999.

DHABHAR, F. S. et al. Effects of stress on immune cell distribution – Dynamics and hormonal mechanisms. **J. Immunol**, v. 154, p. 5.511-5.527, 1995.

DREAU, D. et al. Effects of social conflict on immune responses and E. Coli growth within close chambers in mice. **Physiol. Behav**, v. 76, p. 133-40, 1999.

\_\_\_\_\_. Dynamics of changes certain hematological and biochemical parameters the puerperal period of sheep. **Zivocisna Vyroba**, v. 36, n.10, p. 885-893, 1991.

ELLIS, J. A. Immunophenotype of pulmonar cellular infiltrates in sheep with visceral caseous lymphadenitis. **Vet. Pathol.**, v. 25, p. 362-368, 1988.

ELLIS, J. A. et al. Local production of tumor necrosis factor alpha in Corynebacterium pseudotuberculosis pulmonary lesión in sheep. **Vet. Pathol.**, v. 32, n.1, p. 68-70, 1995.

\_\_\_\_\_. Differential induction of Tumor Necrosis Factor Alpha in ovine pulmonary alveolar macrophages following infection with corynebacterium pseudotuberculosis, Pasteurella haemolytica, or Lentiviruses. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 3.254-3.260, 1991.

FERREIRA NETO, J. M.; BIONDINI, J.; CARVALHO, M. M. Leucograma de caprinos do confinados e em pastoreio semi-extensivo. **Arq. Esc. Méd. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, v. 34, n.2, p. 221-7, 1982.

FERREIRA NETO, J. M. et al. Hemograma de caprinos do nascimento até um ano de idade. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v. 38, n.5, p. 645-656, 1986.

FINKELMAN, F. D. et al. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the Lymphokine B-cell stimulatory factor 1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 83, p. 9.675-9.678, 1986.

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; DALTON, D.; STEWART, T.; BOOM, B. An essential role for interferon-gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Exp. Med.**, n. 178, p. 2.249-2.254, 1993.

FORTAGNE, M.; SCHAFFER, M. Hamatologische Parameter der Probstheidaer Kleinziege in Abhängigkeit von Graviditat Laktation. **Arch. Exp. Veterinarmed.**, v. 43, p. 223-230, mar. 1989.

FURLANETO, C. J. et al. Apolipoproteins A-I and A- II downregulate neutrophil functions. **Lipids**, v. 37, n. 9, p. 925-928, 2002.

GREEN, S. J.; NACY, C. A.; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens. **J. Leukoc. Biol.**, v. 50, p. 93-103, 1991.



HARD, G. C. Immunity to experimental infection with corynebacterium ovis in the mouse peritoneal cavity. **Res. Vet. Sci.**, v. 10, p. 547-554, 1969.

HEYMAN, Y.; MENEZO, Y.; CHESNE, P. In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. **Theriogenology**, Los Altos, v. 27, n. 1, p. 59-68, 1987.

HUBER, H. et al. IgG subclass specificity of human monocytes receptor sites. **Nature**, n. 229, p. 419-420, 1971.

JABBOUR, H. N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with ECG and/or FSH-p. **An. Reprod. Sci.**, v. 26, p. 93-106, 1991.

JOLLY, R. D. Some observations on surface lipos of virulent and attenuated strains of corynebacterium ovis. **J. Appl. Bact**, v. 29, n.1, p. 189-196, 1966.

KAKUCSKA, I. et al. Suppression of thyrotropinreleasing hormone gene expression by interleukin-1 beta in the rat: implications for nonthyroidal illness. **Neuroendocrinology**, v. 59, p. 129-137, 1994.

KAUFMANN, S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol**, n. 11, p. 129-163, 1993.

KING, C.L. 7NUTMAN, T. B. IgG subclasses regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminth infections. Assessment by B cell precursor frequencies. **J. Immunol**, n. 151, p. 458-465, 1993.

KRAJNICA KOVA, M. et al. Dynamic changes in hematological parameters in the blood of sheep at estrus synchronization and in subsequent period of early pregnancy. **Vet. Méd.**, v. 40, n.6, p. 177-180, 1995.

LAN, D. T. B. et al. Role of endogenous tumour necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. **Microbiol. Immunol**, v. 42, p. 863-870, 1998.

LEHNM, W. Y. et al. IL-4 inhibits H2)2 producton and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by INF-y. **The J. Immunol**, v. 143, n.9, p. 3.020-3.024, 1989.

LIO, D. et al. Genotype frequencies of the +874T – A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-y gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. **Europ J Immunogenet.**, n. 29, p. 371-374, 2002.

LLOYD, S. Caseous lymphadenitis in sheep. In: MELLING, M.; ADLER, M. (Ed.) **Sheep and goat practice**. 2. ed. London: WB Saunders, 1998.

MALAN- BOREL, I. et al. Modulation of the immune response by progesterone induced lymphocyte factors. **Scand. J. Immunol.** (SJI-GM486), 1998.

\_\_\_\_\_. Effect of rat placental culture supernatants on cellular and humoral immune responses **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 38, p. 366-373, 1997.

\_\_\_\_\_. Modulation of the humoral immune response of placental secretory factors. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 35, p. 529-533, 1996.

MARGNI, R. A; MALAN-BOREL, I. Inmunologia de la reproducción. In: \_\_\_\_\_. **Inmunologia e Inmunoquímica: fundamentos**. 5. ed. Editorial Médica Panamericana, 1996.

MARQUES JÚNIOR, A . P.; LIMA, W. S.; SAMPAIO, I. B. M. Leucograma de cabras adultas e jovens mantidas em confinamento e semi-confinamento. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootc.**, v. 35, n. 3, p. 331-341, 1983.

MARQUES JÚNIOR, A . P.; SILVA, T. M. F.; BATISTA, R. A . Hemograma de cabras leiteiras nos períodos pré e pós-parto, mantidas em confinamento. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v. 42, n. 3, p. 187-195, 1990.

MATOS, M. S. et al. Hemoglobina, volume globular e leucócitos em caprinos. **Arq. EMV-UFBA**, v. 7, n.1, p. 82-90, 1982.

MBASSA, G. K.; POULSEN, J. S. D. Influence of pregnancy, lactacion and environment to haematology profiles in Danish Landrace dairy goats (*Capra hircus*) of different parity. **Comp. Biochem. Physiol. – B**, v. 100, n. 2, p. 403-412, 1991.

McNATTY, K. P. et al. Superovulation and embryo recovery in goats treated with Ovagem and Folltropin. **N. Z. Vet. J.**, v. 37, p. 27-29, 1989.

MENZIES, P. I.; MUCKLE, C. A. The use of a microglutination assay for the detection of antibodies to *C. pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. **Can J. Vet. Res.**, v. 53, p. 313-318, 1989.

MILLS, P. J. et al. Lymphocyte subset redistribution in response to acute experimental stress: effects of gender, ethnicity, hypertension and the sympathetic nervous system. **Br. Behav. Immun**, v. 9, p. 61-69, 1995.

MODLIN, R. L.; HYATT, L.; WEISS, W. In situ characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 53, p. 17-28, 1983.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol**, n. 136, p. 2.348-2.357, 1986.

\_\_\_\_\_. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 1.213-1.225, 1988.

MOURA COSTA, L. F. et al. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **RBSPA.**, Salvador, v. 3, n.1, p. 1-9, 2002.

MUNRO, J. M.; PODER, J. S.; COTRAN, R. S. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leucocyte accumulation in skin of paio anubis. **Am. J. Path**, n. 135, p. 121-131, 1989.

NAHM, M. H.; SCOTT, M. G; SHACKELFORD, P. G. Expression of human IgG subclasses. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, n. 17, p. 183-196, 1987.

NAIRN, M. E. et al. The possibility of control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE, 3., 1982, Tucson. **Proceedings...** Tucson-AR, 1982, p. 455-457.

NAKANE, A., MINAGAWA, T, KATO, K. 1998 Endogenous tumor necrosis factor is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun**, n. 56, p. 2.563-2.569.

NFI, A. N. Haematological reference values and other blood characteristics of small ruminants at Mankon-Cameroon. I. Haematological values. **Bull. Anim. Health Prod. Afr.**, v. 39, p. 243-245, 1991.

OLIVEIRA, V. S. Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em cabras (*Capra hircus* LINNAEUS, 1758) utilizadas em transferência de embriões. São Paulo, 1992. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

PAULE, B. J. A. et al. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of pseudotuberculosis primary infection in goats: Kinetics of IgG and interferon- production, IgG avidity and antigen recognition by western blotting. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 96, p. 128-139, 2003.

PEPIN, M. et al. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Vet. Res.** v. 28. p. 149-163, 1997.

PETROVSKY, N. Toward a unified model of neuroendocrine-immune interaction. **Immunology & Cell Biology**, v. 79, n. 4, p. 350-357, 2001.

PINHEIRO, A . A . **Métodos de colheita e de inovulação em embriões caprinos (*Capra hircus*, LINNAEUS, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras.** São Paulo, 1993. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

PRAVICA, V.; In vitro production of IFN- $\gamma$  correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- $\gamma$  gene. **Europ J Immunogenetics**, v. 26, p. 1-3, 1999.

PRESCOTT, J. F., MENZIES, P.I., HWANG, Y. T. An interferon-gamma assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. **Vet. Microbiol**, v. 88. p. 287-297, 2002.

PUGH, D. G. Caseous lymphadenitis in sheep in small ruminants. **Prac Noph Am Vet Conf**, n. 11, p. 982, 1997.

REGIS, L. F. et al. Effect of different lectins on the proliferation of goat peripheral blood mononuclear cells. **Small Rumin**, v. 46, p. 71-73, 2002.

REGIS, L. **Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de corynebacterium pseudotuberculosis**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

REMY, B. et al. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle stimulating hormone. **Theriogenology**, v. 36, p. 389-399, 1991.

RIBEIRO, O. C. et al. Avaliação de vacina contra linfadenite caseosa em caprinos mantidos em regime extensivo. **Pesq. Vet. Brás**, n. 8, p. 27-29, 1988.

ROTHEL, J. S. et al. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for detection of tuberculosis in cattle. **Aust. Vet. J.**, v. 67, p. 134-137, 1990.

ROY, A.; SAHNI, K. L.; DATTA, I. C. Studies on certain aspects of sheep and goat husbandry: VII variations in blood corpuscles of sheep and goat during different seasons, pregnancy, parturition and post-parturition period. **Indian J. Vet. Sci.**, v. 35, n.1, p. 24-32, 1965.

SACKS, G.; SARGENT, I.; REDMAN, C. An innate view of human pregnancy. **Immunol**, n. 20, v. 3, p. 114, 1999.

SAS INSTITUTE. **SAS**. Cary, 2000. Software, v. 9.

SCHIWE, M. C. et al. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F<sub>2α</sub> synchronization is compromised by premature luteal regression. **Theriogenology**, v. 34, p. 469, 1990.

SCHREUDER, B. E. C.; TER LAAK, E. A.; DERCKSEN, D. P. Eradication of caseous lymphadenitis in sheep with the help of a newly developed elisa technique. **Vet. Rec.** v. 135, p.174-176, 1994.

SCHRIKANT, P.; BENVENISTE, E. N. The central nervous systems as an immunocompetent organ. **J. Immunol**, v. 157, p. 1819-1822, 1996.

SCOTT, P. et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis T cell line that transfer protective immunity on exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med**, n. 168, p. 1.675-1.684, 1988.

SNAPPER, C. M.; FINKLEMAN, F. D. Immunoglobulin class switching. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental immunology**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Raven Press, 1993.

STEFANSKI, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. **Psychoendocrinol**, v. 25, p. 389-406, 2000.

STING, R.; STENG, G.; SPENGLER, D. Serological studies on corynebacterium pseudotuberculosis infections in goats using enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Vet. Med.**, v. 45, p. 209-216, 1998.



STROBER, W.; FUSS, I. J. O sistema imunológico das mucosas. In: \_\_\_\_\_. Stites DP, Terr AI, Parslow TH. **Imunologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 152-162, 2000.

STUBBINGS, R.B. et al. Serum progesterone concentration associated premature corpus luteum failure in dairy goats. **Can. J. Vet. Res.**, v. 50, p. 369-73, 1986.

SUTHERLAND S. S.; ELLIS, T. M.; MERCY, A. R. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. **Aust. Vet. J.**, v. 64, p. 263-266, 1987.

SZEKERS-BARTHO, J.; CSERNUS, V.; PEJTSIK, B. Progesterone as immunologic blocking factor in human pregnancy serum. **Reprod. Immunol**, v. 3, p. 333-339, 1991.

TERVIT, H. R. et al. Techniques and success of embryo transfer in Angora goats. **N. Z. Vet. J.**, v. 31, p. 67-70, 1983.

TURNBULL, A.V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol. Vet**, v. 79, p. 1-71, 1999.

UNANIAN, M. M. Parâmetros sanguíneos em caprinos jovens da região semi-árida do Nordeste do Brasil. **Pesqui. Agropecu. Brás.**, v. 21(3), p. 293-301, 1986.

VAN RENSBURG, S. J. Ovum production: action of various gonadotrophins in sheep and goats. **Onderstepoort. J. Veter. Reg.**, Indure, v. 31, p. 97-106, 1964.

VERMA, A . K.; PANDIT, R. K.; NEMA, S. P. Certain observations on parturition process in local goats. **Indian Vet. J.**, v. 67, n.4, p. 376-377, 1990.

VIANA, R. B. et al. Influência da gestação e do puerpério sobre o leucograma de caprinos da raça Saanen, criados no Estado de São Paulo. **BRAZ, J. Vet. Res. An. Sci**, v. 39, n.4, p. 196-201, 2002.

VIHAM, V. A.; RAI, P. Certain hematological and biochemical attributes during pregnancy, parturition and post-parturition periods in sheep and goats. **Indian J. An. Sci.**, v. 57, n.11, p. 1.200-1.204, 1987.

WALKER, J. et al. Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. **Clin. Exp. Immunol**, n. 86, p. 13-18, 1991.

WHIPPE, C. A. et al. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial  $\gamma$ -interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, p. 415-419, 1995.

WOOD P. R. et al. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. **Vet. Microbiol**, v. 31, p. 71-79, 1992.

\_\_\_\_\_. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. **Aust. Vet. J.** v. 68, p. 286-290, 1991.

## ANEXO A

TABELA.1 Valores de referência do leucograma na espécie caprina.

Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /ml)	Valores Relativos (%)						Valores Absolutos (ul)						Referência
	BAST.	NEUT.	LINF.	MON.	EOSIN	BASO.	BAST.	NEUT.	LINF.	MON.	EOSI.N.	BASO.	
5,0													COFFIN., 1953
a	0	36	58	2	3,5	0	-	-	-	-	-	-	
3,0													
6,0		30	50										SCHALM., 1958
a	0 - 2	a	a	1 - 2	3 - 8	0-2	-	-	-	-	-	-	
16,0		48	70										
7,7	0	50,3	43,7	3,6	2,3	0	-	-	-	-	-	-	HOLMAN, et al., 1958
12,8	-	-	-	-	-	-	306	6,432	5,017	396	496	141	BIRGEL, 1969
6,0		30	50				0	1.800	3000	60	180	0	FERREIRA NETO
a	raros	a	a	1-4	3-8	0-2	a	a	a	a	a	a	
16,0		48	70				320	7.680	11.200	640	1.280	320	et al., 1977
4,0		30	50					1200	2000	0	50	0	
a	raros	a	a	0-4	1-8	0-2	raros	a	a	a	a	a	MATOS, et al., 1982
3,0		48	70					7200	9000	550	650	120	
1,3	raros	43	51	3	2	1	-	-	-	-	-	-	SMITH ,1994

## ANEXO B

TABELA 2. Valores absolutos dos constituintes do leucograma: média dos resultados de duas leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo e desvio padrão (DP) de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G-I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do início do protocolo experimental; G-II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G-III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G-IV = fêmeas tratadas com norgestomet; G-V = machos; G-VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo VI).

Grupos Experimentais	Dias da Coleta	Leucócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos
GI	0	11,61±2,32	6,13±1,22	0,46±0,09	0,11±0,02	4,62±0,92	0,31±0,06
	5	12,54±2,50	7,17±1,39	<b>0,27±0,05*</b>	0,18±0,03	<b>4,76±0,95*</b>	0,14±0,02
	9	11,40±2,28	6,41±1,28	0,19±0,03	-	4,59±0,91	0,19±0,03
	13	11,72±2,34	6,70±1,33	0,41±0,08	0,02±0,00	<b>4,29±0,85*</b>	0,29±0,05
	16	<b>13,11±2,62*</b>	<b>7,95±1,59*</b>	0,35±0,07	0,05±0,01	<b>4,53±0,90*</b>	0,21±0,04
	21	11,37±2,27	6,15±1,23	<b>0,29±0,05*</b>	0,04±0,00	4,51±0,90	0,36±0,07
GII	0	10,70±2,14	6,24±1,24	<b>0,31±0,06*</b>	0,14±0,02	<b>3,67±0,73*</b>	0,32±0,06
	5	12,70±2,54	7,93±1,58	0,22±0,04	0,048±0,00	4,37±0,87	0,12±0,02
	9	<b>10,51±2,10*</b>	6,31±1,25	0,18±0,03	0,02±0,00	3,92±0,78	<b>0,08±0,01*</b>
	13	11,44±2,88	6,78±1,35	0,07±0,01	-	4,38±0,87	<b>0,20±0,04*</b>
	16	<b>11,61±2,32*</b>	7,73±1,54	<b>0,21±0,04*</b>	<b>0,02±0,00*</b>	<b>3,50±0,70*</b>	<b>0,21±0,04*</b>
	21	9,97±1,99	6,27±1,25*	<b>0,19±0,03*</b>	0,02±0,00	<b>3,26±0,65*</b>	
GIII	0	11,86±2,37	6,63±1,32	0,44±0,08	-	4,45±0,89	0,32±0,06
	5	<b>13,02±2,60*</b>	8,27±1,65	0,18±0,03	-	4,41±0,88	0,15±0,03
	9	12,14±2,42	7,64±1,52	0,12±0,02	0,02±0,00	4,12±0,82	0,21±0,04
	13	13,33±2,66	8,25±1,65	0,31±0,06	0,06±0,01	4,33±0,86	0,36±0,07
	16	<b>11,38±2,27*</b>	6,74±1,34	<b>0,28±0,05*</b>	<b>0,04±0,00*</b>	<b>4,07±0,81*</b>	0,23±0,04
	21	10,95±2,19	<b>6,37±1,24*</b>	<b>0,02±0,00*</b>	0,02±0,00	<b>3,81±0,76*</b>	
GIV	0	11,09±2,21	7,62±1,32	0,33±0,06	0,08±0,01	<b>3,85±0,77*</b>	0,19±0,03
	5	12,07±2,41	6,70±1,34	0,31±0,06	-	4,70±0,94	<b>0,31±0,06*</b>
	9	11,01±2,20	6,71±1,35	0,04±0,00	0,046±0,00	3,77±0,75	0,32±0,06
	13	11,04±2,20	6,29±1,25	0,24±0,04	0,02±0,00	4,25±0,85	0,35±0,07
	16	<b>12,61±2,52*</b>	7,86±1,57	0,22±0,04*	<b>0,08±0,00*</b>	<b>4,13±0,83*</b>	0,28±0,05
	21	11,41±2,28	<b>6,62±1,32*</b>	0,29±0,05*	0,09±0,01	<b>3,95±0,79*</b>	0,32±0,06
GV	0	<b>14,95±2,99*</b>	<b>7,60±1,95*</b>	0,38±0,07	0,12±0,02	<b>6,54±1,30*</b>	0,29±0,05
	5	<b>17,62±3,52*</b>	9,12±1,82	<b>0,24±0,04*</b>	<b>0,03±0,00*</b>	<b>7,79±1,55*</b>	<b>0,42±0,008*</b>
	9	<b>16,18±3,23*</b>	8,25±1,64	<b>0,09±0,01*</b>	-	<b>6,17±1,23*</b>	0,027±0,05
	13	<b>17,73±3,54*</b>	9,79±1,95	<b>0,02±0,00*</b>	0,14±0,02	<b>7,33±1,46*</b>	0,45±0,09
	16	<b>16,43±3,28*</b>	10,06±2,01	0,23±0,04	-	<b>5,63±1,12*</b>	0,45±0,09
	21	<b>11,52±2,30*</b>	<b>7,01±1,40*</b>	<b>0,044±0,00*</b>	0,02±0,00	<b>3,93±0,78*</b>	-
GVI	0	11,88±2,97	<b>6,14±1,53*</b>	<b>0,77±0,19*</b>	0,08±0,02	<b>4,57±1,14*</b>	0,30±0,07
	5	11,93±2,98	<b>6,48±1,62*</b>	<b>0,36±0,09*</b>	0,03±0,00	<b>4,99±1,24*</b>	<b>0,12±0,03*</b>
	9	12,67±3,16	<b>6,02±1,50*</b>	<b>0,60±0,15*</b>	0,12±0,03	<b>5,47±1,36*</b>	0,44±0,11
	13	10,17±2,54	<b>4,81±1,20*</b>	<b>0,43±0,10*</b>	0,05±0,01	<b>4,59±1,14*</b>	0,25±0,06
	16	<b>10,32±2,58*</b>	<b>4,60±1,14*</b>	<b>0,60±0,15*</b>	-	<b>4,68±1,17*</b>	0,41±0,10
	21	10,63±2,65	<b>5,16±1,29*</b>	<b>0,59±0,14*</b>	0,10±0,02	<b>4,44±1,11*</b>	0,33±0,08

Asteriscos (\*) subscritos denotam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) dos dias de coleta entre os grupos.

## Anexo C

TABELA 3. Valores absolutos neutrófilos: média dos resultados de duas leituras de 100 células em esfregaço sanguíneo o desvio padrão (DP) de cinco animais por grupo de estudo duplicado em caprino. (G-I = fêmeas ovariectomizadas 90 dias antes do início do protocolo experimental; G-II = tratadas com valerato de estradiol a cada 2 dias; G-III = fêmeas tratadas com d-clorprostenol; G-IV = fêmeas tratadas com norgestomet; G-V = machos; G-VI = fêmeas sem tratamento hormonal. Todos os grupos foram infectados com  $1 \times 10^9$  UFC de *Corynebacterium pseudotuberculosis* no dia 0, exceto o grupo VI).

Grupos Experimentais	Dias da Coleta	Neutrófilo		
		Segmentado	Bastonete	Total
G1	0	<b>5,89±1,17*</b>	0,24±0,04	6,13±1.22
	5	6,79±1,32	0,38±0,07	7,17±1.39
	9	6,17±1,23	0,24±0,04	6,41±1.28
	13	6,39±1,27	0,31±0,06	6,7±1.33
	16	7,69±1,53	0,26±0,05	7,95±1.59
	21	<b>5,97±1,19*</b>	0,18±0,03	<b>6,15±1.23*</b>
G2	0	5,92±1,18	0,32±0,06	6,24±1.24
	5	7,41±1,48	0,52±0,10	7,93±1.58
	9	6,09±1,21	0,22±0,04	6,31±1.25
	13	6,54±1,30	0,24±0,04	6,78±1.35
	16	<b>7,19±1,43*</b>	0,54±0,10	7,73±1.54
	21	<b>5,91±1,18*</b>	0,36±0,07	<b>6,27±1.25*</b>
G3	0	6,32±1,26	0,31±0,06	6,63±1.32
	5	7,86±1,57	0,41±0,08	8,27±1.65
	9	7,20±1,44	0,44±0,08	7,64±1.52
	13	7,80±1,56	0,45±0,08	8,25±1.65
	16	<b>6,57±1,31*</b>	0,17±0,03	6,74±1.34
	21	<b>6,16±1,23*</b>	0,21±0,00	<b>6,37±1.24*</b>
G4	0	6,35±1,27	0,27±0,05	7,62±1.32
	5	6,49±1,29	0,21±0,04	6,7±1.34
	9	6,35±1,28	0,36±0,07	6,71±1.35
	13	5,92±1,18	0,37±0,07	6,29±1.25
	16	<b>7,63±1,52*</b>	0,23±0,04	7,86±1.57
	21	<b>6,16±1,23*</b>	0,46±0,09	<b>6,62±1.32*</b>
G5	0	<b>7,36±1,47*</b>	0,24±0,48	7,6±1.95
	5	<b>8,85±1,77*</b>	0,27±0,05	9,12±1.82
	9	<b>7,98±1,59*</b>	0,27±0,05	8,25±1.95
	13	<b>9,14±1,82*</b>	0,65±0,00	9,79±2.01
	16	<b>9,73±1,94*</b>	0,33±0,06	10,06±1.40
	21	<b>6,73±1,34*</b>	0,28±0,05	<b>7,01±1.53*</b>
G6	0	<b>5,98±1,49*</b>	0,16±0,04	<b>6,14±1.53*</b>
	5	<b>6,13±1,53*</b>	0,35±0,08	<b>6,48±1.62*</b>
	9	<b>5,69±1,42*</b>	0,33±0,08	<b>6,02±1.50*</b>
	13	<b>4,60±1,15*</b>	0,21±0,05	<b>4,81±1.20*</b>
	16	<b>4,44±1,10*</b>	0,16±0,04	<b>4,6±1.14*</b>
	21	<b>4,92±1,22*</b>	0,24±0,06	<b>5,16±1.29*</b>

Asteriscos(\*) subscritos denotam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) dos dias de coleta entre os grupos experimentais.

## ANEXO D

TABELA 2 Médias e desvios padrão do índice de densidade óptica de imunoglobulina igg total, igm e igg anti *c.pseudotuberculosis*, dos dias após tratamento dos grupos experimentais.

ANTI	DIAS TRATAMENTOS					
CORPO						
GRUPO						
IgG/Cory	0	5	9	13	16	21
I	0,75±0,13 <sup>a</sup>	1,35±0,22 <sup>a</sup>	0,79±0,22 <sup>a</sup>	1,18±0,26 <sup>a</sup>	0,91±0,22 <sup>a</sup>	0,81±0,26 <sup>a</sup>
II	0,93±0,19 <sup>a</sup>	1,41±0,08 <sup>a</sup>	0,90±0,23 <sup>a</sup>	1,02±0,29 <sup>a</sup>	0,80±0,19 <sup>a</sup>	0,88±0,30 <sup>a</sup>
III	0,91±0,33 <sup>a</sup>	1,37±0,17 <sup>a</sup>	0,80±0,14 <sup>a</sup>	0,97±0,29 <sup>a</sup>	0,76±0,30 <sup>a</sup>	1,25±0,29 <sup>a</sup>
IV	0,74±0,26 <sup>a</sup>	1,34±0,12 <sup>a</sup>	0,76±0,13 <sup>a</sup>	0,87±0,17 <sup>a</sup>	0,60±0,15 <sup>a</sup>	0,76±0,23 <sup>a</sup>
V	0,56±0,19 <sup>b</sup>	1,20±0,28 <sup>b</sup>	0,86±0,20 <sup>b</sup>	0,77±0,16 <sup>b</sup>	0,59±0,79 <sup>b</sup>	0,88±0,32 <sup>b</sup>
VI	0,99±0,23 <sup>b</sup>	0,70±0,25 <sup>b</sup>	0,39±0,16 <sup>b</sup>	0,37±0,14 <sup>b</sup>	0,26±0,14 <sup>b</sup>	0,67±0,26 <sup>b</sup>
IgG/total						
I	0,30±0,08 <sup>b</sup>	1,45±0,22 <sup>b</sup>	1,36±0,18 <sup>a</sup>	1,46±0,12 <sup>a</sup>	1,45±0,12 <sup>a</sup>	0,38±0,16 <sup>b</sup>
II	0,43±0,24 <sup>b</sup>	1,49±0,06 <sup>b</sup>	1,48±0,15 <sup>a</sup>	1,34±0,31 <sup>a</sup>	1,45±0,17 <sup>a</sup>	0,73±0,34 <sup>b</sup>
III	0,44±0,25 <sup>b</sup>	1,46±0,11 <sup>b</sup>	1,47±0,08 <sup>a</sup>	1,46±0,13 <sup>a</sup>	1,43±0,17 <sup>a</sup>	1,34±0,29 <sup>b</sup>
IV	0,37±0,12 <sup>b</sup>	1,43±0,12 <sup>a</sup>	1,44±0,11 <sup>a</sup>	1,41±0,15 <sup>a</sup>	1,34±0,16 <sup>a</sup>	0,34±0,29 <sup>a</sup>
V	0,27±0,07 <sup>b</sup>	1,31±0,29 <sup>a</sup>	1,46±0,08 <sup>a</sup>	1,36±0,14 <sup>a</sup>	1,37±0,06 <sup>a</sup>	0,31±0,30 <sup>a</sup>
VI	0,46±0,11 <sup>b</sup>	0,76±0,26 <sup>b</sup>	0,71±0,28 <sup>b</sup>	0,73±0,25 <sup>b</sup>	0,64±0,25 <sup>b</sup>	1,30±0,31 <sup>b</sup>

Letras sobrescritas denotam diferença estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ), dos dias de coleta entre os grupos experimentais.