

## **Avaliação de fatores relacionados com a imunomodulação th1-th2 na co-infecção ovina com *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Haemonchus contortus***

**Evaluation of factors related to th1-th2 immunomodulation in ovine co-infection with**

***Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Haemonchus contortus***

**Evaluación de factores relacionados con la inmunomodulación th1-th2 en ovejas co-infección con**

***Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Haemonchus contortus***

Recebido: 15/12/2023 | Revisado: 01/03/2024 | Aceitado: 04/03/2024 | Publicado: 06/03/2024

### **Lorena Lima Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-4909-4599>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: lasa\_ssa@yahoo.com.br

### **Maria Conceição Aquino de Sá**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8145-7018>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: ceicazoo@hotmail.com

### **Mônica Cardozo Rebouças**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2822-5407>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: reboucsmc@gmail.com

### **Italaney Fehlberg**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6570-498X>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: italafehlberg@hotmail.com

### **José Tadeu Raynal Rocha Filho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2771-0235>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: jtraynal@hotmail.com

### **Marcos da Costa Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3809-0297>  
Universidade Estadual da Bahia, Brasil  
E-mail: macosil@gmail.com

### **Antônio Pedro Fróes de Farias**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2625-9470>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: froes\_pedro@hotmail.com

### **Soraya Castro Trindade**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7125-9114>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: soraya.castrotrindade@gmail.com

### **Roberto José Meyer Nascimento**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4727-4805>  
Universidade Federal da Bahia, Brasil  
E-mail: rmeyer@ufba.br

### **Resumo**

A linfadenite caseosa (LC), cujo agente *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o responsável por desenvolver um processo infeccioso em ovino e caprinos, com consequentes perdas econômicas a cadeia produtiva. Os estados do Nordeste assumem o maior número de casos de prevalência, em virtude de concentrar os maiores rebanhos de pequenos ruminantes do país. Assim como na infecção bacteriana da LC, as parasitoses, a exemplo da causada pelo *Haemonchus contortus*, também geram perdas econômicas na criação de ovinos. MicroRNAs (miRNAs) têm emergido como importantes moléculas regulatórias do sistema imune. Alguns miRNAs produzidos na infecção por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, podem regular negativamente a produção de citocinas como interferon- $\gamma$ , aumentando-se, assim, a resistência do patógeno aos mecanismos de defesa. Para avaliar os níveis séricos de miRNAs e correlacionar com a resposta Th1 em ovinos experimentalmente infectados com *C. pseudotuberculosis* e na co-infecção desta com o helminto *H. contortus*, foi realizado estudo experimental com quatorze ovinos distribuídos em três grupos: controle, infectado e co-infectado, onde foi realizado teste sorológico para LC, ensaio de IFN- $\gamma$  e quantificação de microRNAs, coma as amostras de fezes foram realizadas coproculturas e parasitológico de fezes (OPG). No grupo dos animais co-infectados foi observado aumento dos títulos de anticorpos

IgG, IFN- $\gamma$  manteve-se mais reduzido nos grupos infectado e co-infectado quando comparado ao grupo controle, evidenciando assim, uma possível modulação da resposta imune pelos microRNAs expressos nestes grupos, indicando que ocorre uma modulação da resposta imunológica.

**Palavras-chave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; *Haemonchus contortus*; MicroRNAs; Ovinos.

#### Abstract

Caseous lymphadenitis (CL), whose agent *Corynebacterium pseudotuberculosis* is responsible for developing an infectious process in sheep and goats, with consequent economic losses to the production chain. The Northeastern states have the highest number of prevalence cases, due to having the largest herds of small ruminants in the country. As with the bacterial infection of CL, parasites, such as that caused by *Haemonchus contortus*, also generate economic losses in sheep farming. MicroRNAs (miRNAs) have emerged as important regulatory molecules of the immune system. Some miRNAs produced during infection by intracellular pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*, for example, can negatively regulate the production of cytokines such as interferon- $\gamma$ , thus increasing the pathogen's resistance to defense mechanisms. To evaluate serum levels of miRNAs and correlate with the Th1 response in sheep experimentally infected with *C. pseudotuberculosis* and its co-infection with the helminth *H. contortus*, an experimental study was carried out with fourteen sheep divided into three groups: control, infected and co-infected, where a serological test for LC, IFN- $\gamma$  assay and quantification of microRNAs were carried out. Stool samples were performed with stool cultures and fecal parasitology (OPG). In the group of co-infected animals, an increase in IgG antibody titers was observed, and IFN- $\gamma$  remained lower in the infected and co-infected groups when compared to the control group, thus demonstrating a possible modulation of the immune response by microRNAs expressed in these groups, indicating that a modulation of the immunological response occurs.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; *Haemonchus contortus*; MicroRNAs; Sheep.

#### Resumen

Linfadenitis caseosa (CL), cuyo agente *Corynebacterium pseudotuberculosis* es responsable de desarrollar un proceso infeccioso en ovinos y caprinos, con las consecuentes pérdidas económicas a la cadena productiva. Los estados del Nordeste tienen el mayor número de casos de prevalencia, debido a que cuentan con los mayores rebaños de pequeños rumiantes del país. Al igual que ocurre con la infección bacteriana de CL, los parásitos, como el causado por *Haemonchus contortus*, también generan pérdidas económicas en la ganadería ovina. Los microARN (miARN) se han convertido en importantes moléculas reguladoras del sistema inmunológico. Algunos miARN producidos durante la infección por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, por ejemplo, pueden regular negativamente la producción de citocinas como el interferón- $\gamma$ , aumentando así la resistencia del patógeno a los mecanismos de defensa. Para evaluar los niveles séricos de miRNAs y correlacionarlos con la respuesta Th1 en ovejas infectadas experimentalmente con *C. pseudotuberculosis* y su coinfección con el helminto *H. contortus*, se realizó un estudio experimental con catorce ovejas divididas en tres grupos: control, infectadas y coinfectadas, donde se realizó prueba serológica para LC, ensayo de IFN- $\gamma$  y cuantificación de microRNAs, muestras de heces con coprocultivos y parasitología fecal (OPG). En el grupo de animales coinfectados se observó un aumento en los títulos de anticuerpos IgG, y el IFN- $\gamma$  se mantuvo más bajo en los grupos infectados y coinfectados en comparación con el grupo control, demostrando así una posible modulación de la respuesta inmune por microRNAs. expresado en estos grupos, lo que indica que se produce una modulación de la respuesta inmunológica.

**Palabras clave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; *Haemonchus contortus*; MicroARN; Oveja.

## 1. Introdução

A ovinocultura, juntamente com a caprinocultura, tem apresentado um crescente desenvolvimento no agronegócio brasileiro e, cada vez mais, vem ganhando espaço neste setor. A ovinocultura, em especial, possui uma elevada representatividade nos estados da região Nordeste, incluindo a Bahia. A produção anual desses animais atinge aproximadamente 11 milhões de toneladas de lã, com uma cadeia produtiva formada por 35 mil estabelecimentos agropecuários (Ministério da Agricultura, 2015).

No Brasil, estima-se que a prevalência clínica dos animais infectados já atinja 30% e, assim, grande parte dos rebanhos já estaria acometida por esta infecção (Droppa-Almeida *et al.*, 2015). Os estados do Nordeste assumem o maior número de casos de prevalência, em virtude de concentrar os maiores rebanhos de caprinos e ovinos do país (Meyer *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2011)

Assim como ocorre na infecção bacteriana da LC, as infecções causadas por parasitos, em sua grande maioria, também geram enormes perdas econômicas na criação de ovinos, observadas na redução do desenvolvimento do animal que impacta negativamente em toda a cadeia de produção (diminuição da produção de carne, lã e leite) (Arsenault *et al.*, 2003;

Vale, et al., 2003). Adicionalmente, pode ocorrer também elevada mortalidade desses animais (Lima; Silva, 2012). O agente etiológico de maior incidência nas infecções parasitárias entre os ovinos é o *Haemonchus contortus*, o qual se encontra localizado no abomaso se alimentando do sangue do animal (Shakya, et al., 2009).

As respostas imunes necessárias para combater a LC e a Haemonchose são baseadas no desenvolvimento de células do perfil Th1 produtor de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e células Th2, respectivamente. A regulação destas respostas é requerida para que a homeostasia seja alcançada com eficiente eliminação dos patógenos, porém sem uma patologia associada ao dano tecidual gerado ao longo das respostas (Muraille et al., 2014). Esta regulação ocorre principalmente através de células e citocinas regulatórias (Ojurongbe et al., 2011).

MicroRNAs (miRNAs) têm emergido como importantes moléculas regulatórias do sistema imune. Alguns miRNAs produzidos na infecção por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, podem regular negativamente a produção de citocinas como interferon- $\gamma$ , aumentando-se, assim, a resistência do patógeno aos mecanismos de defesa. Por outro lado, a infecção helmíntica pode estimular a ativação alternativa de macrófagos (macrófagos M2), com a expressão de moléculas como Ym1, também com atividades inibitórias da resposta Th1 (Gill et al., 2000)

Diversos estudos encontraram modificação da expressão gênica em macrófagos e células *natural killer* durante a resposta imune contra o *M. tuberculosis* em sua forma ativa e latente (Berry et al., 2010; Maertzdorf et al., 2011). Essa alteração da composição celular, por sua vez, pode ser regulada por miRNAs (Harapan et al., 2013). Apesar de apenas 1% do transcrito genômico de células eucariontes codificar miRNA, acredita-se que estes possuem ação no controle da atividade de mais de 60% dos genes codificadores de proteínas (Harapan et al., 2013).

Pesquisas afirmam que a infecção por espécies de *Mycobacterium* promoveu uma regulação positiva dos miR-99b, miR-144, miR-29 e miR-125b em diferentes tipos celulares (Harapan et al., 2013). Esses miRNAs têm como alvo diferentes genes que são importantes na imunidade contra o agente da tuberculose. Assim, a regulação positiva desses miRNAs ajuda o *Mycobacterium* a sobreviver no interior das células de defesa do hospedeiro por meio da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias através de variados mecanismos (Harapan et al., 2013).

Dessa forma, esta pesquisa almejou avaliar o perfil dos miRNAs séricos miR-21, miR-29a, miR-29b, miR-99a, miR-99b e miR-125b e a resposta de IFN- $\gamma$  nos animais infectados com a bactéria *C. pseudotuberculosis* e nos animais co-infectados com o parasito *H. contortus*, a fim de melhor compreender a modulação da resposta imune nos dois grupos.

## 2. Metodologia

### 2.1 Animais

O estudo foi realizado utilizando um total de 14 ovinos sadios sem raça definida, de ambos os sexos e com idade de seis meses, os quais foram divididos em três grupos: **Grupo 1** (controle) constituído por 3 animais sadios; **Grupo 2** (experimental) formado por 6 animais infectados com *C. pseudotuberculosis*; e o **Grupo 3** (experimental) composto por 5 animais co-infectados com *Haemonchus contortus*.

Ao longo de todo estudo, os ovinos foram acompanhados clinicamente e nas práticas de manejo por veterinário responsável para evitar infecções secundárias. Os animais dos diferentes grupos foram confinados, separadamente em baias, na unidade experimental do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, localizada em Salinas da Margarida, Bahia, com alimentação apropriada e água *ad libitum*. Antes da chegada dos animais à fazenda, todo o local do confinamento passou por processo de assepsia com o uso de sanitizantes.

## 2.2 Cepa utilizada e infecção dos animais

Os ovinos do grupo infectado (Experimental) foram inoculados com a cepa virulenta VD57 de *C. pseudotuberculosis* no dia zero com  $1 \times 10^7$  UFC/mL, por via subcutânea na região pré-escapular direita. Esta linhagem pertence à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia- ICS- UFBA e foi cultivada por 48h em caldo BHI. O grupo controle recebeu 1 mL de salina estéril pela mesma via.

### 2.2.1 Contagem bacteriana

A contagem bacteriana para infecção foi realizada de acordo com (Sampaio et al., 2019).

### 2.2.2 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras dos grupos experimentais nos pontos 0, 7, 14, 28, 42, 49, 60, 70 e 90 dias após infecção:

- Sangue: amostras foram coletadas, em condições assépticas, em todos os pontos utilizando o sistema convencional de seringa. Este foi destinado para os seguintes fins:

- ✓ Ensaio de IFN-gama. Coletado em tubos contendo heparina.
- ✓ qPCR para miRNAs: coletados em tubos contendo EDTA. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas após a coleta; o plasma obtido foi aliquoteado em tubos eppendorf e armazenados em gelo seco para preservação da estabilidade dos miRNAs até a chegada ao LABIMUNO;
- ✓ ELISA indireto para *C. pseudotuberculosis*. Coletado em tubos secos para posterior obtenção de soro.

- Fezes: Foi coletada diretamente da ampola retal dos animais. A seguir, cada amostra foi depositada em sacola plástica individualmente e armazenadas apropriadamente até realização do OPG e coprocultura para *H. contortus*.

## 2.3 Parasitológico de fezes (OPG)

Realizado para detecção e quantificação de ovos por grama (OPG) de fezes de nematódeos como o *Haemonchus contortus*, permitindo uma estimativa do grau de infecção do animal (Gordon & Whitlock, 1939; Whitlock, 1948).

## 2.4 Coprocultura e coinfeção com *H. CONTORTUS*

Para a realização da técnica de coprocultura utilizou-se como matéria orgânica quatro gramas de fezes autoclavadas de ovinos misturadas à maravalha, na proporção de mais ou menos duas partes de maravalha para uma de fezes, e adicionou a solução contendo os ovos do nematódeo obtidos após a oviposição, além do macerado dos parasitas. Em seguida, cada uma das misturas foi colocada em copos de vidro. As culturas foram mantidas na estufa à temperatura 37°C, por um período de sete dias, tempo necessário para a evolução das larvas infectantes (L3) do parasito, de acordo ao descrito por Ueno (1995). A coinfeção foi realizada no ponto 42 por via oral de 10 mL de suspensão via oral contendo 1000 larvas L3 por mililitro de solução (Mackinnon et al., 2010).

## 2.5 Ensaio de IFN- $\gamma$ (BOVIGAM)

A quantificação de IFN- $\gamma$  em culturas de sangue foi feita segundo Rebouças et al., (2011), a partir do sobrenadante de cultura de sangue total. As amostras de sangue colhidas (5mL em tubos heparinizados) em cada tempo amostral foram dispostas em placas de cultivo celular de 24 poços sendo para cada animal utilizados três poços com 1mL. O primeiro poço foi o controle negativo, sem adição de estímulo; o segundo poço o controle positivo, sendo adicionado 5 $\mu$ g de mitógeno pokeweed (PWM); e o terceiro poço foi adicionado 40 $\mu$ g das proteínas 42 secretadas da linhagem VD57 pela técnica de TPP. Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis no fluxo laminar. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa

de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi coletado após centrifugação das amostras durante 5 minutos a 8000rpm e então submetidos à avaliação da produção de INF- $\gamma$ , através do teste de ELISA Sandwich, utilizando o Kit Ovino INF- $\gamma$  (Mabtech, Suécia).

## 2.6 ELISA indireto ANTI- *C. pseudotuberculosis*

Teste realizado segundo Carminati e colaboradores (2003), placas de 96 poços (Corning Costar 3590, USA) foram sensibilizadas com 100  $\mu$ l/poço do sobrenadante da cultura diluído 1:100 em tampão carbonato bicarbonato 0,05M, (pH 9.6) overnight a 4°C. O bloqueio ocorreu por duas horas à temperatura ambiente com 200  $\mu$ l/poço de salina tamponada com fosfato Tween-20 (PBS-T20) contendo 5% de leite desnatado. Em seguida, 100  $\mu$ l/poço dos soros testes diluídos 1:100 em PBS-T20 contendo 1% de leite desnatado foram adicionados e incubados por uma hora à 37°C. Posteriormente, adicionou-se às placas 100  $\mu$ l/poço de Imunoglobulina G (IgG) anti-ovelha conjugada à peroxidase (Bethill) diluída 1:6000 em PBS-T seguida por uma incubação de 45 minutos a 37 °C. Foram adicionados 100  $\mu$ l/poço da solução reveladora contendo 0,4mg/mL de OPD (Sigma-Aldrich-Alemanha), como cromógeno, e 0,03% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), como substrato. As placas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e a reação foi interrompida com 50  $\mu$ l/poço de uma solução 4N de ácido sulfúrico. Cada etapa foi precedida por 5 lavagens com PBS-T20. As leituras de densidade ótica (DO) foram realizadas em Leitor automático de ELISA (Modelo 2720 Applied Biosystems) a 492 nm. Foram considerados reativos soros com resultados de DO maior que 0.300 (ponto de corte), como definido pela curva ROC (“Receiver Operating Characteristic”).

## 2.7 Reação em cadeia da polimerase quantitativa para detecção de miRNA

### 2.7.1 Extração dos miRNAs das amostras de plasma

Realizado com o kit Quiamp viral RNA Mini Kit (Qiagen, Brasil) conforme instruções do fabricante, com modificações na velocidade de centrifugação que foi de 8.000 e 16.000 x g por 1 minuto, onde indicado. Após etapas de purificação, os RNAs foram eluídos em 20  $\mu$ l do tampão AVE e, a seguir, armazenados a -80°C até realização da síntese de cDNA.

### 2.7.2 Produção de cDNA

O primer utilizado nesta etapa foi um primer universal, ou seja, parecia com qualquer fragmento de RNA. Sua sequência, mostrada a seguir, foi obtida a partir do software miRPrimer 2: miR – RT – Uni – R: 5'-CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'

A produção de cDNA foi realizada, otimizada a partir do protocolo do fabricante, em um volume final de 10  $\mu$ L e continha 0,1 Unidades da enzima E. Coli Poly (A) polymerase (Invitrogen, USA), 10 U da enzima M-MuLV-RT (New England Biolabs, USA), 1mM do dATP E.Coli Poly(A) polymerase, 0,1 mM do dNTP (4 x 2,5mM), 5mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão E. Coli Poly (A) 1 x e 1  $\mu$ M do primer miR-RT-Uni-R. De cada amostra de RNAs extraídos foram utilizados 3,5  $\mu$ L . As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf) sob as seguintes condições: 42°C por 60 minutos, seguida de 95°C por 5 minutos.

### 2.7.3 Primers dos miRNAs

O desenho dos primers foi realizado através do software miRPrimer 2 com base na similaridade de sequências de miRNAs dos animais ovelha, cabra, boi e humano (Quadro 1).

**Quadro 1** - Sequências dos primers de miRNAs utilizados.

Oar – miR021 – F	GCAGTAGCTTATCAGACTGATG
Oar – miR021 – R	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTGTCAAC
Oar – miR029a – F	CGCAGTAGCACCATCTGA
Oar – miR029a – R	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACCGA
Oar – miR029b – F	CAGTAGCACCATTTGAAATCAG
Oar – miR029b – R	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTACAC
Oar – miR099a – F	CAGAACCCGTAGATCCGA
Oar – miR099a – R	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTCAAGA
btachihsa – miR099b – F	CCCGTAGAACCGACCT
btachihsa – miR099b – R	TCCAGTTTTTTTTTTTTTCGCA
Oar – miR125b – F	GCAGTCCCTGAGACCCT
Oar – miR125b – R	CCAGTTTTTTTTTTTTTTCACAAGT

Fonte: Elaboração própria.

### 2.7.4 Amplificação por qPCR

A quantificação dos miR-21, miR-29a, miR-29b, miR-99a, miR-99b e miR-125b foi realizada com a utilização do GoTaq qPCR Master Mix (Promega) conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL e continham 1 mM do Go Taq qPCR Mastermix Master Mix, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada primer e 5 µL do cDNA. As reações foram realizadas no termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: incubação inicial a 95°C por 2 minutos (para ativação da enzima) seguidos por 50 ciclos de 94°C por 20 segundos (desnaturação) e 58°C por 35 segundos (anelamento e extensão).

Pré-PCR, PCR e Pós-PCR foram realizados em áreas fisicamente separadas para minimizar o risco de contaminação cruzada e um controle negativo contendo água foi incluído em todas as reações para avaliar possíveis surgimentos de contaminação nos reagentes.

### 2.8 Análise estatística

A análise estatística utilizada para avaliar os resultados dos microRNAs nos três diferentes grupos (controle, infectado e coinfestado) foi a ANOVA (análise de variâncias). O programa estatístico Graph Pad Prism versão 5.0 foi utilizado para a realização dos cálculos, com valores de  $p < 0,05$  considerados estatisticamente significantes. A análise dos dados do Ensaio de IFN- $\gamma$  foi realizada a partir da avaliação da reatividade das amostras verificando que os dados eram não paramétricos. Então, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o teste de comparação múltipla de Dunn.

### 2.9 Comitê de ética

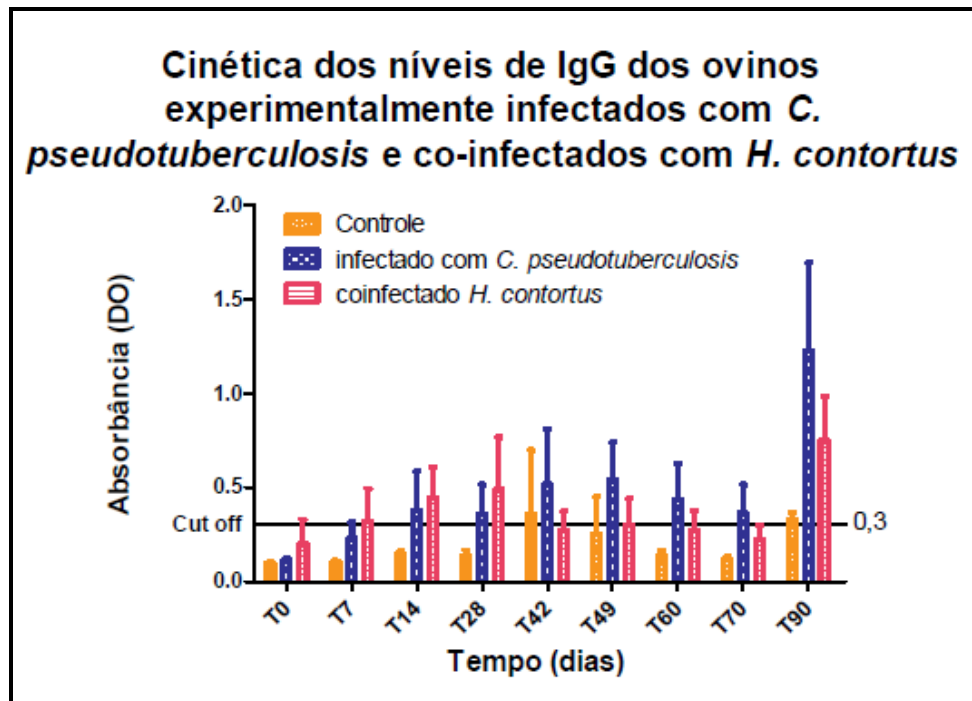
Estudo realizado com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia sob protocolo nº 082/2015.

## 3. Resultados

### 3.1 ELISA indireto

Na Figura 1 é possível observar que os animais do grupo controle (G1) permaneceram com resultado sorológico anti-Coryne negativo durante todo o período do estudo, apresentando valores de DO abaixo do ponto de corte (0,3). Os animais do grupo infectado (G2) apresentaram leve reatividade sorológica anti-Coryne a partir do ponto 14 com grande elevação no ponto 90. Os animais do grupo coinfestado (G3) apresentaram aumento dos títulos de anticorpos nos pontos 7, 14 e 28, apresentando estabilidade até o ponto 70 e no ponto 90 observou-se um grande pico. Após a coinfeção no ponto 42 observou-se uma diminuição reatividade para *Cp* nos pontos 42, 49, 60 e 70.

**Figura 1** – Sorologia do ELISA dos grupos G1, G2 e G3 ao longo de 90 dias.



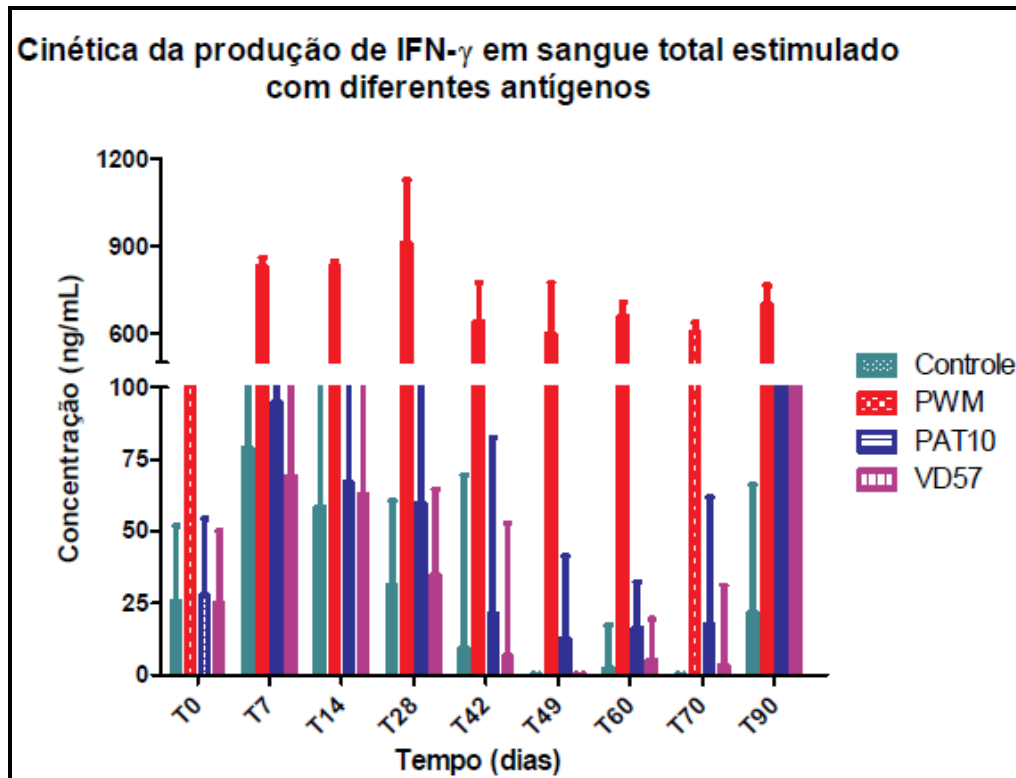
Fonte: Elaboração própria.

É possível observar a soroconversão comparando os grupos infectados ao grupo controle.

### 3.2 Ensaio de IFN- $\gamma$

As células sem estímulo secretaram níveis basais de IFN- $\gamma$  em todos os tempos. Quando estimulado com mitógeno PKW, todas as células secretam níveis elevados desta citocina como já se esperava por se tratar de um controle positivo. O estímulo com antígeno TPP da linhagem VD57 não apresentou diferenças em quase todos os tempos, excetuando-se, no tempo 90, onde ambos os grupos (G1 e G2) apresentaram níveis aumentados de IFN- $\gamma$  (Figura 2).

**Figura 2** - Mediana das DOs do IFN  $\gamma$  nos grupos com e sem estímulo ao longo de 90 dias.



Fonte: Elaboração própria.

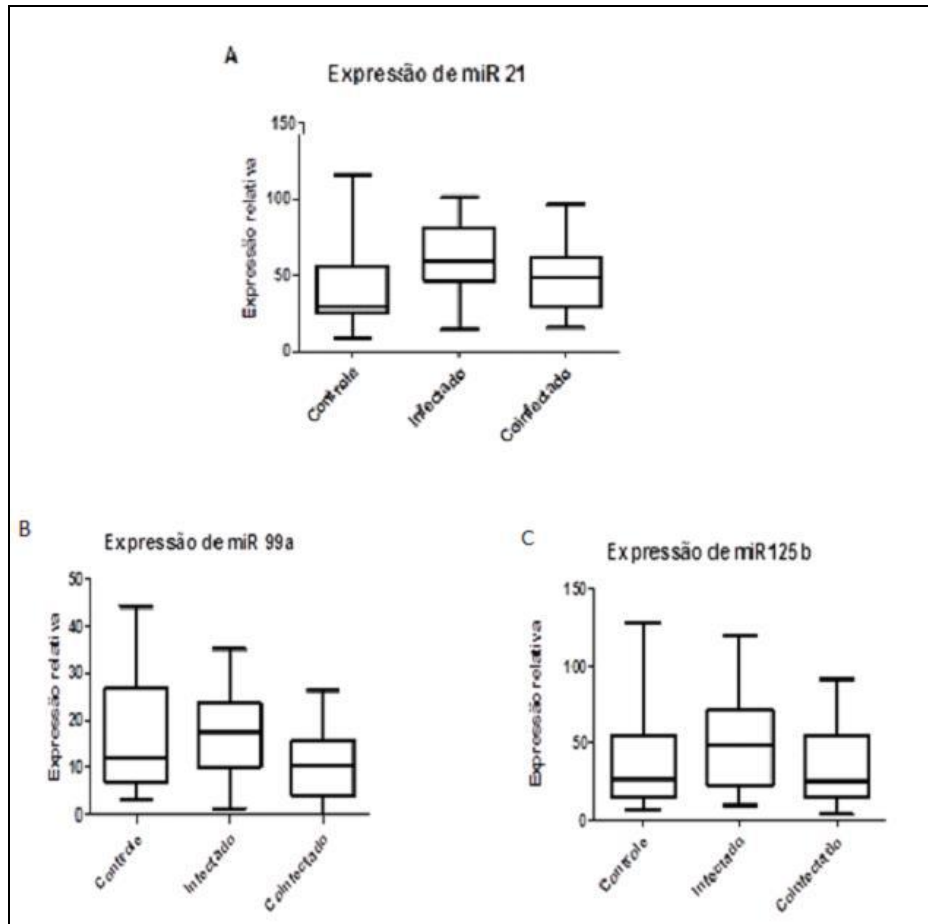
A produção de interferon gama só foi observada mediante estímulo com antígeno TPP no tempo 90.

### 3.3 Quantificação dos miRNAs por qPCR

Não houve diferença significativa na expressão dos miRNAs 21, 99a e 125b nos grupos G1, G2 e G3 ao longo dos 90 dias (Figura 3). No entanto, houve aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da expressão do mir-29a no grupo infectado em relação ao coinfectado (Figura 4). De acordo com a Figura 5 podemos observar que houve diferença de expressão do miR-29b nos três grupos, com redução significativa no G3 (coinfectado) ( $p < 0,01$ ). Por último, podemos perceber na Figura 6 que a expressão de miR-99b foi reduzida nos grupo G3 quando comparado ao controle, com significância estatística ( $p < 0,05$ ).



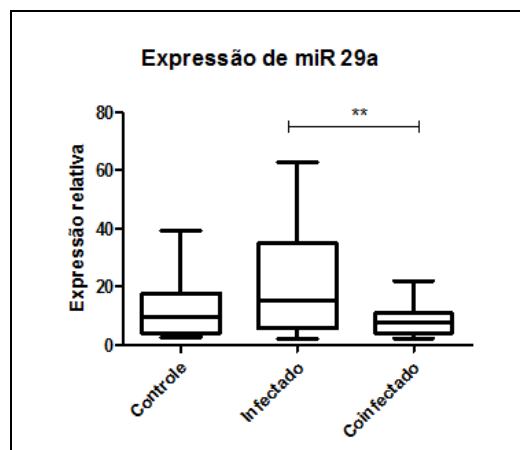
**Figura 3** - Expressão relativa normal de mir-21, mir-99a e miR125b nos 3 grupos ao longo de 90 dias ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Elaboração própria.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos ao longo do experimento.

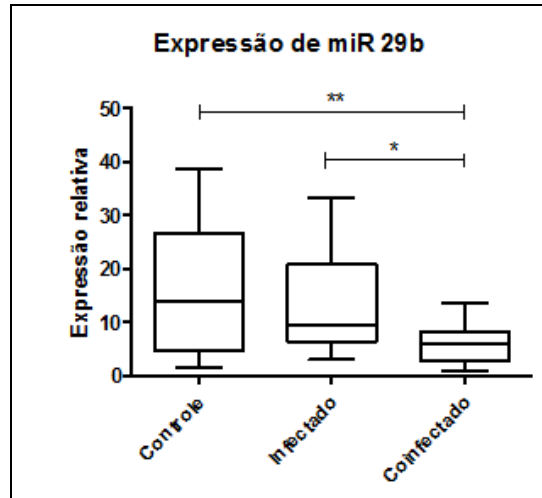
**Figura 4** - Expressão do miR- 29a ao longo de 90 dias. Há uma diferença significativa entre o G2 e G3 ( $p < 0,01$ ).



Fonte: Elaboração própria.

Houve aumento significativo no grupo infectado.

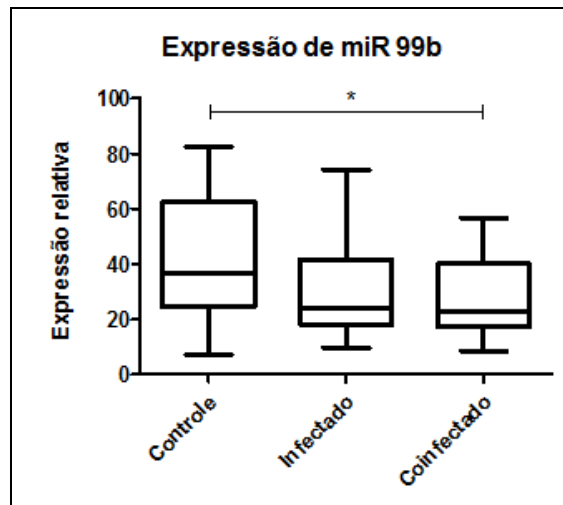
**Figura 5** - Expressão reduzida do miR- 29b ao longo de 90 dias. Há diferença significativa entre G2 e G3 ( $p < 0,05$ ) e G1e G3 ( $p < 0,01$ ).



Fonte: Elaboração própria.

Houve diferença significativa nos três grupos.

**Figura 6** - Expressão diminuída do miR- 99b ao longo de 90 dias no G3 ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Elaboração própria.

Observa-se redução significativa no grupo três.

#### 4. Discussão

A linfadenite caseosa e a haemonchose em populações de ovinos continuam sendo um problema que acomete a região nordeste do Brasil. A alta prevalência desta doença, principalmente na Bahia e Minas Gerais (Meyer, 2003; Guimarães et al., 2009), acarreta muitos prejuízos, principalmente para os pequenos criadores que exploram os animais para subsistência familiar.

No presente estudo, buscou-se investigar a expressão de alguns microRNAs que atuam como moléculas regulatórias do sistema imune. Dos 14 animais analisados, verificamos uma expressão significativa do mir-29a nos grupos infectados com *C. pseudotuberculosis* (G2) e coinfectados (G3). Destes, os animais do grupo 2 apresentaram uma significância maior de expressão em relação ao grupo 3. A expressão aumentada deste miR está de acordo com o ensaio de IFN- $\gamma$ , o qual mostrou que

os animais do grupo infectado apresentaram uma redução dos níveis desta citocina quando estimulados com o antígeno TPP da cepa VD57. Estes resultados estão alinhados também com a literatura, onde é verificada a inibição da produção desta citocina quando há superexpressão de mir-29<sup>a</sup> (Awuah et al., 2014).

Estudos clínicos *in vitro* mostram elevados níveis do miR-29 durante a infecção por espécies virulentas de *Mycobacterium* (FU et al., 2011). Este microRNA diminui a resposta imune contra o microrganismo através da redução da produção de IFN- $\gamma$ , já que esta citocina é o alvo deste miR (Ma et al., 2011; Harapan et al., 2013). Dessa forma, a superexpressão de miR-29 na infecção por tuberculose impede a atividade fagocítica do macrófago e aumento da apoptose de células envolvidas na resposta imune contra *M. tuberculosis* (Harapan et al., 2013). Esses dados corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, onde verificou-se uma diminuição nos níveis desta citocina nos grupos infectados e coinfetados quando estimulados com o antígeno de VD57. Além disso, observou-se também uma significância estatística de aproximadamente 100% em relação ao mir-29a. Podemos destacar também, que houve uma maior expressão deste microRNA no grupo infectado em relação ao grupo coinfetado.

A expressão de mir-29b também foi observada neste estudo. No entanto, verificamos uma significância de 99% na expressão deste microRNA nos animais controle e coinfetados. A quantificação de IFN- $\gamma$  nestes grupos nos mostra baixos títulos desta citocina, tendo os animais coinfetados níveis ainda mais baixos quando comparados ao grupo controle. A literatura relata uma vasta atuação de mir-29b em estudos que associam sua regulação em diferentes patologias como carcinomas, doenças cardíacas, patologias neurodegenerativas, doença inflamatória intestinal, dentre outras. Porém, não encontramos investigações clínicas deste microRNA com *C. pseudotuberculosis* e/ou outras bactérias gram-positivas e nem associações com *H. contortus*.

A expressão de mir-99b foi estatisticamente mais significativa no grupo controle quando comparada aos reduzidos níveis nos animais coinfetados, apesar da dosagem de IFN- $\gamma$  ter revelado níveis mais reduzidos nos animais coinfetados. De acordo com Harapan et al., 2013, o mir-99b alveja o mRNA de TNF $\alpha$  que, por sua vez, regula a expressão de várias citocinas e fatores transcricionais envolvidos na diferenciação de células T. Foi revelado em seu estudo, que o tratamento de células dendríticas que possuíam mir-99b associadas a TNF alfa bloqueado resultou no aumento da morte bacteriana. O estudo realizado por SINGH et al., 2008 mostrou que, em murinos, células dendríticas de ratos deficientes de MyD88 expostos a *M. tuberculosis*, houve a indução de superexpressão de mir-99b. Análises posteriores verificaram que o bloqueio de mir-99b resulta em redução significativa do crescimento bacteriano e regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$  (Harapan et al., 2013). Assim, a inibição do crescimento de *M. tuberculosis* pode ser devido ao aumento da produção destas citocinas pró-inflamatórias. Esses dados confirmam que o mir-99b tem importante papel no crescimento de *M. tuberculosis*, através da inibição da produção de TNF $\alpha$  permitindo que a bactéria resista à resposta imune do hospedeiro, sobrevivendo nos fagócitos do hospedeiro e desenvolvendo a doença.

Não há relatos na literatura de uma possível modulação deste microRNA em estudos realizados com *H. contortus*.

## 5. Conclusão

Observamos que os níveis de IFN- $\gamma$  em células do sangue periférico estimulados *in vitro* com o antígeno da cepa VD 57, mantiveram-se mais reduzidos nos grupos infectado e co-infectado quando comparado ao grupo controle, evidenciando assim, uma possível modulação da resposta imune pelos microRNAs expressos nestes grupos (infectado e coinfetado). Dos seis microRNAs investigados, verificamos a expressão de três (mir-29a, mir-29b e mir-99b) indicando um provável papel na modulação da resposta imune nos animais infectados e coinfetados.

Em trabalhos futuros, é importante conhecer o papel de cada um dos microRNAs expressos ao longo do processo infeccioso, sendo necessário o acompanhamento do animais por um período mais longo, dosando também outras citocinas e auxiliem na compreensão do mecanismo de reposta imunomodulatório positivo ou negativo.

## Referências

- Afum-Adjei Awuah, A., Ueberberg, B., Owusu-Dabo, E., Frempong, M., Jacobsen, M. (2014). Dynamics of T-cell IFN- $\gamma$  and miR-29a expression during active pulmonary tuberculosis. *International Immunology*. 26(10):579-82. 10.1093/intimm/dxu068.
- Arsenault, J., Girard, C., Dubreuil, P., Daignault, D., Galarneau, J., Boisclair, J., Simar, D., Belanger, D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 59, 1-2, 67-81. 10.1016/s0167-5877(03)00060-6.
- Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, Wilkinson KA, Banchereau R, Skinner J, Wilkinson RJ, Quinn C, Blankenship D, Dhawan R, Cush JJ, Mejias A, Ramilo O, Kon OM, Pascual V, Banchereau J, Chaussabel D, O'Garra A. (2010) An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*. 19:466(7309):973-7. 10.1038/nature09247.
- Carminat, R., Bahia, R., Moura-Costa, L. F., Paule, B. J. A., Vale, V. L., Regis, L., Freire, S. M., Nascimento, I., Schaer, R., & Meyer, R. (2003). Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências Medicas e Biológicas*, 2(1), 88-93. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v2i1.4256>.
- Droppa-Almeida, D., Vivas, W. L. P., Silva, K. K. O., Rezende, A. F. S., Simionatto, S., Meyer, R., Lima-Verde, I. B., Delagostin, O., Borsuk, S., & Padilha, F. F. (2015). Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. *Vaccine*, 34, 1091-1096. 10.1016/j.vacina.2015.12.064.
- Fu, Y., Yi, Z., Wu, X., Li, J., Xu, F. (2011). Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(12):4246-51. 10.1128/JCM.05459-11.
- Gill, H. S., Altmann, K., Cross, M. L., Husband, A. J. (2000). Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology*. 99(3):458-63. 10.1046/j.1365-2567.2000.00974.x.
- Gordon, H. M. & Whitlock, H. V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal Council for Scientific and Industrial Research*, 12(1), 50-52.
- Guimarães, A. S., Carmo, F. B., Heinemann, M. B., Portela, R.W., Meyer, R., Lage, A. P., Seyffert, N., Miyoshi, A., Azevedo, V., & Gouveia, A. M. (2011). High sero-prevalence of caseous lymphadenitis identified in slaughterhouse samples as a consequence of deficiencies in sheep farm management in the state of Minas Gerais, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 8, 7, 68. 10.1186/1746-6148-7-68.
- Guimarães, A.S., Seyffert, N., Bastos, B.L., Portela, R.W.D., Meyer, R., Carmo, F.B., Cruz, J.C.M., McCulloch, J.A., Lage, A.P., Heinemann, M.B., Miyoshi, A., Azevedo, Vasco., Gouveia, A.M.G. (2009). Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Ruminant Research*, 87, 86-91. 10.1016/j.smallrumres.2009.09.027.
- Harapan, H., Fitra, F., Ichsan, I., Mulyadi, M., Miotto, P., Hasan, N.A., Calado, M., Cirillo, D.M. (2013). The roles of microRNAs on tuberculosis infection: meaning or myth? *Tuberculosis (Edinb)*. 93(6):596-605.10.1016/j.tube.2013.08.004.
- Lima, H.L. & Silva, S. (2012). *Haemonchus contortus*: Um problema na ovinocultura. *Sul Brasil Rural*. v. 91.
- Ma, F., Xu, S., Liu, X., Zhang, Q., Xu, X., Liu, M., Hua, M., Li, N., Yao, H., Cao, X. (2011). The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- $\gamma$ . *Nature Immunology*. 12(9):861-9. 10.1038/ni.2073.
- MacKinnon, K.M., Zajac, A.M., Kooyman, F.N., Notter, D.R. (2010). Differences in immune parameters are associated with resistance to *Haemonchus contortus* in Caribbean hair sheep. *Parasite Immunology*. 32(7):484-93. 10.1111/j.1365-3024.2010.01211.x.
- Maertzdorf, J., Repsilber, D., Parida, S.K., Stanley, K., Roberts, T., Black, G., Walzl, G., Kaufmann, S.H. (2011). Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis. *Genes Immunology*. 12(1):15-22. 10.1038/gene.2010.51.
- MEYER, R. (2003). *Corynebacterium tuberculosis* e seu hospedeiro: aspectos da imunidade, do imunodiagnóstico e da prevalência. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Brasil.
- Meyer, R., Regis, L., Vale, V., Paule, B., Carminat, R., Bahia, R., Moura-Costa, L., Schaer, R., Nascimento, I., Freire, S. (2005). In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15:107(3-4):249-54. 10.1016/j.vetimm.2005.05.002.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Link de acesso: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em Junho de 2015.
- Muraille, E., Leo, O., Moser, M. (2014). TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Frontiers in Immunology*. 26:5:603. 10.3389/fimmu.2014.00603.
- Ojurongbe, O., Adegbayi, A.M., Bolaji, O.S., Akindele, A.A., Adefioye, O.A., Adeyeba, O.A. (2011). Asymptomatic falciparum malaria and intestinal helminths co-infection among school children in Osogbo, Nigeria. *Journal of Research in Medical Sciences*. 16(5):680-6.
- Rebouças, M.F., Portela, R.W., Lima, D.D., Loureiro, D., Bastos, B.L., Moura-Costa, L.F., Vale, V., Miyoshi, A., Azevedo, V., Meyer, R. (2011). *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic

marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Journal of veterinary diagnostic investigation*; 23(2); 213-220. <https://doi.org/10.1177/104063871102300204>

Sampaio, G.P., Vale, V.L.C., Moura-Costa, L.F., Fraga, R.E., de Melo Santos, H.H., de Sá, M.D.C.A., Bstos, B.L., Raynal, J.T., Trindade, S.C., Meyer, r. (2019). Padronização de técnicas por citometria de fluxo para avaliar *Corynebacterium pseudotuberculosis* células fagocitárias murinas. *Pubvet*; 13; 150. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n11a443.1-9>

Shakya, K.P., Miller, J.E., Horohov, D.W. (2009) A Th2 type of immune response is associated with increased resistance to *Haemonchus contortus* in naturally infected Gulf Coast Native lambs. *Veterinary Parasitology*. 7;163(1-2):57-66. 10.1016/j.vetpar.2009.03.052.

Singh, S.K., Pal Bhadra, M., Girschick, H.J., Bhadra, U. (2008). MicroRNAs--micro in size but macro in function. *FEBS Journal*. 275(20):4929-44. 10.1111/j.1742-4658.2008.06624.x.

UENO, H. (1995). Cultivo quantitativo de larvas de nematódeos gastrintestinais de ruminantes com tentativa para pré-diagnóstico. Tokyo, Japan, p.138.

Vale, V., Freire, S., Ribeiro, M., Regis, L., Bahia, R., Carminati, R., Paule, B.J.A., Nascimento, I., Meyer, R. (2003). Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*; 2(2); 192-200. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v2i2.4286>

Whitlock, H. V. (1948). Some modifications of the McMaster eggs counting technique and apparatus. *Journal Council for Scientific and Industrial Research*, 21, 177-180.