

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Dissertação de Mestrado

**Construção de um mutante para o gene *sigH*
codificador do fator sigma alternativo σ^H e
análise do papel desse fator na resposta de
Corynebacterium pseudotuberculosis a
diferentes condições de estresse ambiental**

Bianca Mendes Souza

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Azevedo

BELO HORIZONTE

Julho – 2011

Bianca Mendes Souza

**Construção de um mutante para o gene *sigH*
codificador do fator sigma alternativo σ^H e
análise do papel desse fator na resposta de
Corynebacterium pseudotuberculosis a
diferentes condições de estresse ambiental**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-
Graduação em Genética, Departamento de Biologia
Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

Co-orientador: Prof. Dr. Vasco Azevedo

BELO HORIZONTE

Julho – 2011

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu pai Edivar, à minha mãe Maria José e ao meu noivo Lucas que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida.

*“Todos estes que aí estão
Atravancando o meu caminho,
Eles passarão.
Eu passarinho!”
(Mario Quintana)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais pela excelente formação acadêmica que me foi oferecida;

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES por financiarem este projeto de mestrado;

À coordenação, professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Genética do ICB-UFMG;

Aos membros da banca por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho;

Ao meu orientador prof. Dr. Anderson Miyoshi pela oportunidade e pela grande ajuda fornecida;

Ao meu co-orientador prof. Dr. Vasco Azevedo pela confiança depositada em mim;

Aos colegas do LGCM por contribuírem para o meu crescimento científico e por me auxiliarem na realização dos experimentos;

À Caroline, minha dupla, por dividir comigo momentos de alegria e de tristeza durante todo o ano de 2010;

Ao Lucas pelo carinho, paciência e companheirismo;

E, principalmente, aos meus pais por sempre lutarem comigo pelos meus sonhos.

A todos vocês, o meu mais sincero “obrigada”!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Linfadenite caseosa	4
1.2. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	5
1.2.1. Aspectos microbiológicos gerais	5
1.2.2. Fatores de virulência	6
1.2.2.1. Fosfolipase D	7
1.2.2.2. Lipídeos tóxicos da parede celular	7
1.2.2.3. Novos candidatos	7
1.3. Fatores sigma bacterianos	8
1.3.1. Propriedades gerais	8
1.3.2. Classificação	11
1.3.3. Fator sigma alternativo σ^H	15
1.3.3.1. Fator sigma alternativo σ^H de <i>C. pseudotuberculosis</i>	19
1.4. Regulação pós-traducional dos fatores sigma bacterianos	20
1.4.1. Fatores anti- σ bacterianos	21
1.4.2. Fator anti- σ^H	23
1.5. Potencial terapêutico dos fatores sigma bacterianos	23
1.6. Justificativa de realização do trabalho	24
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Linhagens bacterianas e condições de cultivo	28
3.2. Manipulação do DNA	28
3.3. Resolução eletroforética	28
3.4. Geração da linhagem mutante $\Delta sigH$ de <i>C. pseudotuberculosis</i>	29
3.4.1. Extração de DNA genômico de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002	29
3.4.2. Amplificação de uma região interna do gene <i>sigH</i>	30
3.4.3. Clonagem do fragmento interno do gene <i>sigH</i> no sistema TOPO	31
3.4.4. Produção de <i>E. coli</i> eletrocompetente	32

3.4.5. Transformação de <i>E. coli</i> Top10	33
3.4.6. Extração de DNA plasmidiano de <i>E. coli</i> em pequena escala	33
3.4.7. Confirmação do evento de clonagem	34
3.4.7.1. Confirmação por PCR	34
3.4.7.2. Confirmação por digestão enzimática	35
3.4.7.3. Confirmação por sequenciamento	35
3.4.8. Produção de <i>C. pseudotuberculosis</i> eletrocompetente	36
3.4.9. Transformação de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002	37
3.5. Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante $\Delta sigH$ de <i>C. pseudotuberculosis</i>	39
3.5.1. Extração de DNA genômico de <i>C. pseudotuberculosis</i> $\Delta sigH$	39
3.5.2. Confirmação por PCR	39
3.6. Caracterização morfológica, bioquímica e molecular da linhagem mutante $\Delta sigH$ de <i>C. pseudotuberculosis</i>	43
3.6.1. Coloração de Gram	43
3.6.2. Testes bioquímicos	43
3.6.3. PCR-multiplex	44
3.7. Resistência das linhagens tipo-selvagem e mutante ($\Delta sigH$) de <i>C. pseudotuberculosis</i> a condições de estresse <i>in vitro</i>	45
3.7.1. Condições de estresse	45
3.7.2. Avaliação da resistência relativa	46
3.8. Análises bioinformáticas e estatísticas	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Geração da linhagem mutante $\Delta sigH$ de <i>C. pseudotuberculosis</i>	51
4.2. Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante $\Delta sigH$ de <i>C. pseudotuberculosis</i>	55
4.3. Caracterização morfológica, bioquímica e molecular da linhagem mutante $\Delta sigH$ de <i>C. pseudotuberculosis</i>	60
4.4. Resistência das linhagens tipo-selvagem e mutante ($\Delta sigH$) de <i>C. pseudotuberculosis</i> a condições de estresse <i>in vitro</i>	62
4.4.1. Estresse ácido	63
4.4.2. Estresse térmico	70
4.4.3. Estresse oxidativo	74
4.4.4. Estresse osmótico	82
4.4.5. Discussão geral	90
5. CONCLUSÕES	92

6. PERSPECTIVAS	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
8. ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Holoenzima RNAP procariótica	9
Figura 1.2. Reconhecimento de uma região promotora pela holoenzima RNA polimerase- σ^{70}	12
Figura 1.3. Representação da organização das regiões conservadas da estrutura dos fatores sigma	13
Figura 1.4. Rede regulatória do fator σ^H de <i>C. glutamicum</i>	18
Figura 1.5. Representação do contexto genômico do gene <i>sigH</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	19
Figura 1.6. Seqüência de nucleotídeos do gene <i>sigH</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	20
Figura 1.7. Panorama do resultado de similaridade obtido para a seqüência do gene <i>sigH</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> , utilizando a ferramenta Blastn	20
Figura 1.8. Representação simplificada da interação entre um fator σ^{ECF} e o seu fator anti- σ	22
Figura 1.9. Seqüência de nucleotídeos do gene <i>rshA</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	23
Figura 1.10. Panorama do resultado de similaridade obtida para a seqüência do gene <i>rshA</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> , usando a ferramenta Blastn	23
Figura 3.1. Representação esquemática do vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [™]), destacando-se o sítio de clonagem múltipla do mesmo	31
Figura 3.2. Representação esquemática do evento de recombinação homóloga simples entre o plasmídeo pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [™]) contendo o fragmento interno do gene <i>sigH</i> e o gene propriamente dito presente no cromossomo bacteriano para a geração da linhagem mutante $\Delta sigH$ deficiente para o fator sigma alternativo σ^H	38
Figura 3.3. Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para a confirmação da mutação na linhagem 1002 ($\Delta sigH$) de <i>C. pseudotuberculosis</i>	42
Figura 3.4. Representação esquemática da etapa inicial do experimento realizado com o propósito de se avaliar a resistência das linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante ($\Delta sigH$) de <i>C. pseudotuberculosis</i> a agentes causadores de estresse	48
Figura 3.5. Esquema ilustrativo dos procedimentos adotados para o monitoramento das curvas de crescimento em intervalos de tempo específicos	49
Figura 4.1. Produto da amplificação da região interna do gene <i>sigH</i>	51
Figura 4.2. Confirmação da presença do fragmento interno do gene codificador do fator sigma alternativo σ^H no vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®] através de PCR	52

Figura 4.3. Confirmação da presença do fragmento interno do gene codificador do fator sigma alternativo σ^H no vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [™]) através da digestão com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> (Invitrogen [™])	53
Figura 4.4. Resultado de similaridade obtido para a sequência do fragmento interno do gene do fator sigma alternativo σ^H de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 inserido no vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®] , utilizando a ferramenta Blastn	54
Figura 4.5. Produtos da reação de mPCR para a identificação de <i>C. pseudotuberculosis</i>	57
Figura 4.6. Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i> para o gene do fator sigma alternativo σ^H através de ensaios de PCR	58
Figura 4.7. Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i> para o gene do fator sigma alternativo σ^H através de um ensaio de PCR utilizando a combinação de iniciadores sigH _e -F-sigH _e -R	59
Figura 4.8. Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i> para o gene do fator sigma alternativo σ^H através de um ensaio de PCR utilizando as combinações de iniciadores M13-F – SigH _e -F e M13-R – SigH _e -R	62
Figura 4.9. Curvas de crescimento das linhagens tipo-selvagem 1002 (wt) e mutante para o fator sigma alternativo σ^H (Δ sigH) de <i>C. pseudotuberculosis</i> em caldo BHI	63
Figura 4.10. Diferentes condições de estresse encontradas por bactérias patogênicas no ambiente intrafagossômico	64
Figura 4.11. Representação dos mecanismos de resistência ao estresse ácido presentes em bactérias Gram-positivas	65
Figura 4.12. Curvas de crescimento e viabilidade das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H (Δ sigH) quando foram expostas ao agente causador do estresse ácido (pH 5,0) em duplicata e quando crescidas em condições normais (sem estresse)	67
Figura 4.13. Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H (Δ sigH) quando expostas ao agente causador do estresse ácido (pH 5,0) com o crescimento e a viabilidade percentuais das mesmas quando cultivadas em condições normais (sem estresse)	68
Figura 4.14. Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais relativos da linhagem 1002 selvagem (wt) com o crescimento e a viabilidade percentuais relativos da linhagem mutante para o fator σ^H (Δ sigH) de <i>C. pseudotuberculosis</i> quando estas foram expostas ao agente causador do estresse ácido (pH 5,0)	69

Figura 4.15. Curvas de crescimento e viabilidade das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) quando foram expostas ao agente causador do estresse térmico (50°C) em duplicata e quando crescidas em condições normais (sem estresse)	71
Figura 4.16. Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) quando expostas ao agente causador do estresse térmico (50°C) com o crescimento e a viabilidade percentuais das mesmas quando cultivadas em condições normais (sem estresse)	72
Figura 4.17. Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais relativos da linhagem 1002 selvagem (wt) com o crescimento e a viabilidade percentuais relativos da linhagem mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) de <i>C. pseudotuberculosis</i> quando estas foram expostas ao agente causador do estresse térmico (50°C)	73
Figura 4.18. Esquema do processo de fosforilação oxidativa que ocorre nas cadeias transportadoras de elétrons de organismos eucariotos e procariotos (aeróbios estritos e facultativos)	75
Figura 4.19. Esquema exemplificativo de como as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelas células fagocíticas podem causar danos às bactérias patogênicas	77
Figura 4.20. Curvas de crescimento e viabilidade das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) quando foram expostas ao agente causador do estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 70mM) em duplicata e quando crescidas em condições normais (sem estresse)	79
Figura 4.21. Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) quando expostas ao agente causador do estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 70mM) com o crescimento e a viabilidade percentuais das mesmas quando cultivadas em condições normais (sem estresse)	80
Figura 4.22. Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais relativos da linhagem 1002 selvagem (wt) com o crescimento e a viabilidade percentuais relativos da linhagem mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) de <i>C. pseudotuberculosis</i> quando estas foram expostas ao agente causador do estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 70mM)	81
Figura 4.23. Esquema geral da percepção do estímulo e da transdução de sinais em resposta aos estresses hipo e hiperosmótico em <i>C. glutamicum</i>	83
Figura 4.24. Representação esquemática do comportamento do sistema de absorção BetP durante a resposta de <i>C. glutamicum</i> ao estresse hiperosmótico	84
Figura 4.25. Representação esquemática da transdução de sinais pelo sistema MtrAB durante a resposta de <i>C. glutamicum</i> ao estresse hiperosmótico	85

Figura 4.26. Curvas de crescimento e viabilidade das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) quando foram expostas ao agente causador do estresse osmótico (NaCl 5M) em duplicata e quando crescidas em condições normais (sem estresse)	87
Figura 4.27. Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) quando expostas ao agente causador do estresse osmótico (NaCl 5M) com o crescimento e a viabilidade percentuais das mesmas quando cultivadas em condições normais (sem estresse)	88
Figura 4.28. Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais relativos da linhagem 1002 selvagem (wt) com o crescimento e a viabilidade percentuais relativos da linhagem mutante para o fator σ^H ($\Delta\sigma^H$) de <i>C. pseudotuberculosis</i> quando estas foram expostas ao agente causador do estresse osmótico (NaCl 5M)	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Fatores sigma alternativos envolvidos na virulência de diferentes bactérias patogênicas	15
Tabela 1.2. Genes codificadores de fatores sigma em corinebactérias	17
Tabela 3.1. Iniciadores utilizados para a amplificação de um fragmento interno do gene <i>sigH</i>	30
Tabela 3.2. Iniciadores utilizados para a confirmação da mutação na linhagem 1002 ($\Delta sigH$) de <i>C. pseudotuberculosis</i>	39
Tabela 3.3. Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para a confirmação da mutação na linhagem 1002 ($\Delta sigH$) de <i>C. pseudotuberculosis</i> e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados	40
Tabela 3.4. Características bioquímicas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	44
Tabela 3.5. Iniciadores utilizados na reação de mPCR para a identificação de <i>C. pseudotuberculosis</i>	45
Tabela 3.6. Condições de estresse <i>in vitro</i>	46
Tabela 4.1. Resultado dos testes bioquímicos feitos para a identificação de <i>C. pseudotuberculosis</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius
(O₂)¹ – superóxido
2CSs – sistemas de transdução de sinal de dois componentes
ADI – arginina deiminase
ATP – trifosfato de adenosina
BHI – infusão cérebro-coração
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
C – citosina
CMN – *Corynebacterium* – *Mycobacterium* – *Nocardia*
DNA – ácido desoxirribonucléico
DO – densidade óptica
ECF – função extracitoplasmática
ETC – cadeia transportadora de elétrons
Fe₂⁺ - íon ferroso
Fe-S – ferro-enxofre
G – guanina
GAD – glutamato descarboxilase
H₂O – água
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HCl – ácido clorídrico
HO* – radical hidroxila
HO₂⁺ – íon dioxigênio hidrogênio
HOCl – ácido hipocloroso
HSPs – proteínas de choque térmico
kb – quilobase
kDa – quilodalton
LB – Luria-Bertani
LC – linfadenite caseosa
LDH – lactato desidrogenase
log – logaritmo
M – molar
mg – miligrama
min – minuto
mL – mililitro

mM – milimolar
mPCR – PCR multiplex
mRNA – RNA mensageiro
NaCl – cloreto de sódio
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
O² – oxigênio
ORF – fase de leitura aberta
pb – par(es) de base(s)
PCR – reação da cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
PLD – fosfolipase D
PM – peso molecular
PUFA – ácidos graxos poliinsaturados
RACE-PCR – PCR de amplificação rápida das extremidades do cDNA
rDNA – DNA ribossômico
RNAP – RNA polimerase
ROS – espécies reativas do oxigênio
rpm – rotações por minuto
UFC – unidades formadoras de colônia
wt – tipo-selvagem
ZAS – fatores anti-sigma associados ao zinco

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, causadora da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. Para causar uma infecção bem sucedida, este patógeno intracelular facultativo precisa responder de modo eficiente às alterações do ambiente extracelular, sendo capaz de sobreviver às condições adversas encontradas no organismo hospedeiro. Um dos principais mecanismos utilizados por bactérias patogênicas para alcançar este objetivo consiste na ativação transitória de genes específicos de resposta aos estresses ambientais extracelulares por fatores sigma (σ) alternativos da RNA polimerase. Com o seqüenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais e Rede Paraense de Genômica e Proteômica, foi possível identificar sete fatores sigma alternativos nesta bactéria: os fatores sigma B, C, D, E, H, K e M. Dentre estes, destaca-se o fator σ^H , o qual tem sido associado à virulência em *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria filogeneticamente próxima de *C. pseudotuberculosis*, e à regulação de componentes importantes da resposta aos estresses térmico e oxidativo tanto em *M. tuberculosis* quanto em *Corynebacterium glutamicum*. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo do papel dos fatores sigma alternativos de *C. pseudotuberculosis* na resposta a diferentes condições de estresse *in vitro* e na virulência da bactéria. Neste trabalho, foi construída uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* deficiente para o fator σ^H , utilizando-se um plasmídeo que não se replica nessa espécie bacteriana, e foi avaliada a resistência desta linhagem aos estresses ácido, térmico, oxidativo e osmótico, *in vitro*, por meio da comparação das curvas de crescimento da linhagem mutante para o fator σ^H e da linhagem 1002 selvagem quando expostas às diferentes condições de estresse. Não foram observadas diferenças significativas na susceptibilidade da linhagem mutante para o fator σ^H aos estresses ácido, térmico e oxidativo em relação à linhagem 1002 selvagem. Contudo, foi verificado que esta linhagem é significativamente mais susceptível ao estresse osmótico do que a linhagem 1002 selvagem, indicando que o fator σ^H deve desempenhar um papel importante para a resposta da bactéria a esta condição de estresse e, possivelmente, para a sua sobrevivência no interior dos macrófagos e para a sua virulência.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a Gram-positive bacterium, which causes caseous lymphadenitis in sheep and goats. In order to cause a successful infection, this facultative intracellular pathogen needs to respond efficiently to changes in the extracellular environment, thus, being able to survive to the harsh conditions encountered in its host organism. One of the main mechanisms used by pathogenic bacteria to achieve this goal is the transient activation of specific genes in response to extracellular stresses by the action of the alternative sigma (σ) factors of RNA polymerase. After the sequencing of the genome of *C. pseudotuberculosis* by Rede Genoma de Minas Gerais and Rede Paraense de Genômica e Proteômica, it was identified seven alternative sigma factors in this bacterium, namely the sigma factors B, C, D, E, H, K and M. Among these, the σ^H factor stands out since it has been linked to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*, a bacterium that is closely related to *C. pseudotuberculosis*, and to the regulation of important components of *M. tuberculosis*'s as well as of *C. glutamicum*'s response to heat shock and oxidative stress. In this context, our research group has been studying the role of the alternative sigma factors in *C. pseudotuberculosis*'s response to different stress conditions *in vitro* and in its virulence. In this work, therefore, we constructed a strain of *C. pseudotuberculosis* deficient for the σ^H factor, using a plasmid that does not replicate in this species, and evaluated its resistance to acid, heat, oxidative and osmotic stresses *in vitro* by the comparison of the growth curves of the mutant strain and of the wild-type strain when they were exposed to these stress conditions. There were no significant differences in the susceptibility of the mutant strain for acid, heat and oxidative stresses in relation to the susceptibility of wild-type strain. However, it was found that this strain is significantly more susceptible to osmotic stress than the wild-type strain, showing that the σ^H factor most probably plays an important role in *C. pseudotuberculosis*'s response to this stress condition and, possibly, in this bacterium's survival within macrophages and in its virulence.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Linfadenite caseosa

A linfadenite caseosa (LC), cujo agente etiológico é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é uma doença infecto-contagiosa crônica que acomete pequenos ruminantes (Williamson, 2001; Dorella *et al.*, 2006a), a qual foi descrita pela primeira vez por Churchward, em 1934, na Austrália (Collett *et al.*, 1994).

Levando em consideração que somente o Brasil arrecadou aproximadamente 7,4 milhões de dólares no ano 2000 com a exportação de peles de caprinos e ovinos (Castro, 2009), pode-se dizer que essa patologia é economicamente relevante uma vez que está associada com a redução da produção de lã, carne e leite, a menor eficiência reprodutiva dos animais afetados e a condenação de carcaças e couros em abatedouros (Arsenault *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006a).

Com uma distribuição mundial, a LC é prevalente em países nos quais a ovinocaprinocultura é intensa, como a Austrália, a Nova Zelândia, a Inglaterra, a África do Sul, o Canadá, os Estados Unidos e o Brasil (Williamson, 2001; Arsenault *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006a). No caso deste, o qual possui 3% do rebanho mundial de caprinos e ovinos, a estimativa é de que a maior parte dos rebanhos esteja infectada, sendo a Região Nordeste, onde se encontra a maior parte dos rebanhos brasileiros, a mais afetada (Alves & Pinheiro, 1997; Ribeiro *et al.*, 2001; Castro, 2009). Em Minas Gerais, a LC já tem sido observada em frequências bastante altas – 75,8% entre ovinos (Guimarães *et al.*, 2009) e 78,9% entre caprinos (Seyffert *et al.*, 2010) – sendo encontrada principalmente nos criatórios da Região Norte do estado (Faria *et al.*, 2004; Seyffert *et al.*, 2010).

Geralmente, a LC é introduzida em rebanhos sadios por animais adquiridos de rebanhos em que há histórico de infecção por *C. pseudotuberculosis* (Castro, 2009), sendo que a transmissão da doença se dá por contato direto com secreções ou material contaminado (Williamson, 2001). Além disso, a entrada do organismo patogênico no organismo hospedeiro pode ser facilitada pela presença de feridas na pele (Williamson, 2001), as quais podem ser causadas por procedimentos de manejo do animal, tais como a tosquia, a castração, o tratamento do cordão umbilical e o uso de agulhas contaminadas, assim como por fatores naturais, como feridas feitas por arbustos pontiagudos e espinhos (Alves & Pinheiro, 1997).

A LC pode apresentar duas formas clínicas diferentes que, em alguns casos, podem ocorrer simultaneamente no mesmo animal, sendo a primeira a LC externa, considerada

mais comum, na qual são formados abscessos em nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos e a segunda a LC visceral, em que são desenvolvidos abscessos em alguns órgãos internos (Piontkowski & Shivvers, 1998), as quais ocorrem do seguinte modo: uma vez transmitida, *C. pseudotuberculosis* é drenada para o linfonodo mais próximo do sítio de infecção tanto em sua forma livre quanto em sua forma fagocitada. Depois, macrófagos e células polimorfonucleares se acumulam nesse linfonodo e fagocitam a bactéria, sendo que a multiplicação dessas células bacterianas no ambiente intrafagossômico ocasiona a morte das células hospedeiras, originando lesões pirogranulomatosas. Posteriormente, várias dessas lesões coalescem, formando, assim, um ou mais granulomas, o que, por sua vez, resulta no acúmulo de material caseoso, o qual permanece encapsulado e contido (Kuria *et al.*, 2001). Ademais, eventualmente, a infecção atinge os órgãos internos – como os pulmões, os rins, o fígado e o baço – do animal afetado (Piontkowski & Shivvers, 1998). Além disso, o animal doente pode, ainda, não apresentar nenhum sintoma (forma assintomática da LC), dificultando, desse modo, as análises epidemiológicas acerca da prevalência da doença (Paton *et al.*, 1994; Arsenault *et al.*, 2003).

O tratamento da LC pode ser feito por meio do uso de antibióticos, apesar de não ser considerada uma alternativa eficiente. Essa inviabilidade ocorre devido ao alto custo dessa terapia e pelo fato dessas drogas não serem capazes de penetrar na cápsula dos abscessos, o que, por sua vez, torna o tratamento ineficiente (Aiello *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 2002). Uma alternativa à antibioticoterapia é, portanto, a realização da drenagem e da extirpação dos linfonodos superficiais que foram acometidos pela doença. No entanto, práticas como essas não são viáveis no caso de serem acometidos os linfonodos e órgãos internos (Alves & Pinheiro, 1997).

1.2. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

1.2.1. Aspectos microbiológicos gerais

Dentro da Classe Actinobacteria, a qual é caracterizada, principalmente, pelo alto conteúdo de G+C no genoma de seus membros, encontra-se um grupo de microrganismos chamado de Grupo CMN. Este, por sua vez, é caracterizado pela organização da parede celular – a qual é baseada na presença de um complexo de polímeros composto por peptídeoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos – de seus membros, os quais pertencem aos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (Dorella *et al.*, 2006a).

Pode-se dizer que algumas das espécies que compõem o Grupo CMN se destacam pelo elevado potencial de emprego biotecnológico, como *Corynebacterium glutamicum* (Castro, 2009), que tem sido amplamente empregada na produção industrial de vários aminoácidos e ácidos nucléicos (Ehira *et al.*, 2009). Todavia, nesse grupo, existem, também, espécies que se destacam pelo seu caráter patogênico, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium diphtheriae* – respectivamente as causadoras da tuberculose e da difteria em humanos – e *C. pseudotuberculosis* – de grande relevância veterinária (Castro, 2009).

C. pseudotuberculosis, a qual é o agente etiológico da LC, foi descrita, pela primeira vez, em 1888, a partir de um caso de linfagite em bovinos, por Edmond Isidore Etienne Nocard. Alguns anos depois, em 1891, Hugo Von Preisz isolou uma bactéria bastante similar de um abscesso renal de um ovino, a qual foi chamada de “bacilo de Preisz-Nocard” (Collett *et al.*, 1994; Dorella *et al.*, 2006a).

Esse microrganismo é uma bactéria Gram-positiva que não possui cápsula, não esporula, é imóvel e possui fímbrias. Além disso, reações em testes bioquímicos dos seus isolados apresentam resultados bastante variados, principalmente no que diz respeito à sua habilidade fermentativa. *C. pseudotuberculosis* também é fosfolipase e catalase positiva, oxidase negativa e β -hemolítica. Ademais, de um modo geral, as linhagens isoladas de pequenos ruminantes não são capazes de reduzir nitrato (Dorella *et al.*, 2006a).

Organismo patogênico intracelular facultativo, *C. pseudotuberculosis* é capaz de infectar diversos animais, como as cabras, as ovelhas, os cavalos, as lhamas, os búfalos, os camelos, os antílopes e os primatas (Baird & Fontaine, 2007). Além disso, essa bactéria já havia sido associada à ocorrência de pelo menos 25 casos de infecção humana até o ano de 2005, indicando, assim, o seu elevado potencial zoonótico (Liu *et al.*, 2005) ocupacional uma vez que quase a totalidade das pessoas infectadas são aquelas que mantêm contato com os animais doentes, como os seus criadores e médicos veterinários (Ribeiro *et al.*, 2001).

1.2.2. Fatores de virulência

Apesar do processo patogênico da LC ser relativamente bem compreendido, pouco se sabe sobre os determinantes moleculares de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* (McKean *et al.*, 2005; 2007a; Dorella *et al.*, 2006b). No entanto, dois desses fatores de virulência são bem caracterizados, sendo o primeiro a fosfolipase D e, o segundo os lipídeos tóxicos da parede celular bacteriana (Castro, 2009; Pacheco, 2010; Domingueti, 2011).

1.2.2.1. Fosfolipase D

A fosfolipase D (PLD – do inglês, *Phospholipase D*), uma exotoxina considerada como o principal determinante molecular de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1999), foi isolada pela primeira vez em 1940 e, desde então, tem sido detectada em todas as linhagens isoladas desse microrganismo (Domingueti, 2011). Ademais, foi demonstrado que, em infecções experimentais, linhagens mutantes Δpld de *C. pseudotuberculosis* não são capazes nem de causar os abscessos típicos da LC e nem de se disseminarem dentro do seu organismo hospedeiro, o que, por sua vez, mostra que essa toxina tem um papel fundamental no estabelecimento dessa enfermidade (Hodgson *et al.*, 1992).

Esse fator de virulência, o qual é codificado por um gene monocistrônico de cópia única no cromossomo bacteriano denominado *pld* (Williamson, 2001; McKean *et al.*, 2007a), promove a hidrólise de ligações éster na esfingomielina de células de mamíferos (Coyle e Lipsky, 1990; Hodgson *et al.*, 1990; McNamara *et al.*, 1995) e, desse modo, contribui para que a bactéria se disperse do sítio inicial de infecção para sítios secundários dentro do hospedeiro (Williamson, 2001).

1.2.2.2. Lipídeos tóxicos da parede celular

Os lipídeos tóxicos que compõem a parede celular bacteriana, além de permitirem a sobrevivência de *C. pseudotuberculosis* no meio ambiente por longos períodos de tempo (Baird & Fontaine, 2007), contribuem para a proteção desse microrganismo contra a ação degradativa das enzimas presentes nos fagolisossomos e, também, para a sua aderência (Radostits *et al.*, 2002).

Além disso, parece haver uma relação direta entre a porcentagem desses lipídeos tóxicos na superfície da parede celular da bactéria e a indução dos abscessos crônicos, o que também pode ser sugerido pelo fato de que as linhagens mais virulentas de *C. pseudotuberculosis* possuem uma proporção maior desses compostos do que as linhagens mais atenuadas (Domingueti, 2011).

1.2.2.3. Novos candidatos

Recentemente, foram identificados quatro genes – *fagA*, *fagB*, *fagC* (os quais constituem o operon *fagABC*) e *fagD* – que contribuem para a virulência de *C. pseudotuberculosis* (Domingueti, 2011). Esses genes, os quais se situam numa região

genômica próxima a do gene *pld*, estão envolvidos com a absorção de ferro por essa bactéria, a qual deve ser capaz de adquirir ferro em ambientes onde ocorre a escassez desse nutriente. Isso foi demonstrado uma vez que caprinos infectados com uma linhagem mutante $\Delta fagB$ de *C. pseudotuberculosis* não apresentaram abscessos, o que, por sua vez, indica que a sobrevivência bacteriana dentro do organismo hospedeiro foi prejudicada (Billington *et al.*, 2002).

Ademais, a busca pelos determinantes moleculares de virulência de vários organismos patogênicos tem chamado a atenção de diversos grupos de pesquisa para as proteínas reguladoras da expressão gênica (Kazmierczak *et al.*, 2005) uma vez que esses patógenos têm a necessidade de se adaptar a diferentes condições ambientais durante o curso da infecção, resistindo, assim, às respostas adaptativas do organismo hospedeiro. *C. pseudotuberculosis*, a qual é capaz de sobreviver às condições adversas do meio ambiente por até oito meses antes de infectar um de seus hospedeiros (Baird & Fontaine, 2007), é exposta a diversas condições ambientais, desde o seu ponto de entrada no organismo do hospedeiro até o estabelecimento das suas lesões (McKean *et al.*, 2007a; 2007b).

Além disso, ao contrário de certos organismos patogênicos como *M. tuberculosis*, *C. pseudotuberculosis* não impede a fusão entre o fagossomo e o lisossomo nos macrófagos (Tashjian & Campbell, 1983), sendo capaz de resistir ao ambiente hostil do fagolisossomo, o qual é caracterizado pelo baixo pH, alta atividade proteolítica e grande potencial oxidativo (Tashjian & Campbell, 1983; Rohde *et al.*, 2007). Isso, por sua vez, indica que as mudanças na expressão gênica têm um papel importante na resposta desse microrganismo às condições de estresse por ele enfrentadas, as quais se tornam absolutamente necessárias para o desenvolvimento de uma infecção bem-sucedida.

1.3. Fatores sigma bacterianos

1.3.1. Propriedades gerais

Nos organismos procariotos, o início da transcrição é considerado o estágio mais importante da regulação da expressão gênica (Rodrigue *et al.*, 2006; Pátek & Nesvĕra, 2010), sendo a holoenzima RNA polimerase (RNAP) a responsável pela transcrição do DNA em RNA mensageiro (mRNA). A holoenzima RNAP procariótica funcional é composta por um cerne constituído de cinco subunidades (α_2 , β , β' and ω) e de mais uma subunidade dissociável denominada fator sigma (σ) (Figura 1.1) (Manganelli *et al.*, 2004; Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nesvĕra, 2010).

Os fatores sigma são uma classe de proteínas cuja associação com o cerne da RNAP proporciona um mecanismo para respostas celulares mediadas pelo redirecionamento do início da transcrição (Kazmierczak *et al.*, 2005). Ademais, além de conter vários, se não todos, os determinantes para o reconhecimento de promotores e conferir especificidade à holoenzima RNAP (Sachdeva *et al.*, 2009), esses fatores também contribuem para a separação da dupla fita de DNA durante esse processo (Kazmierczak *et al.*, 2005).

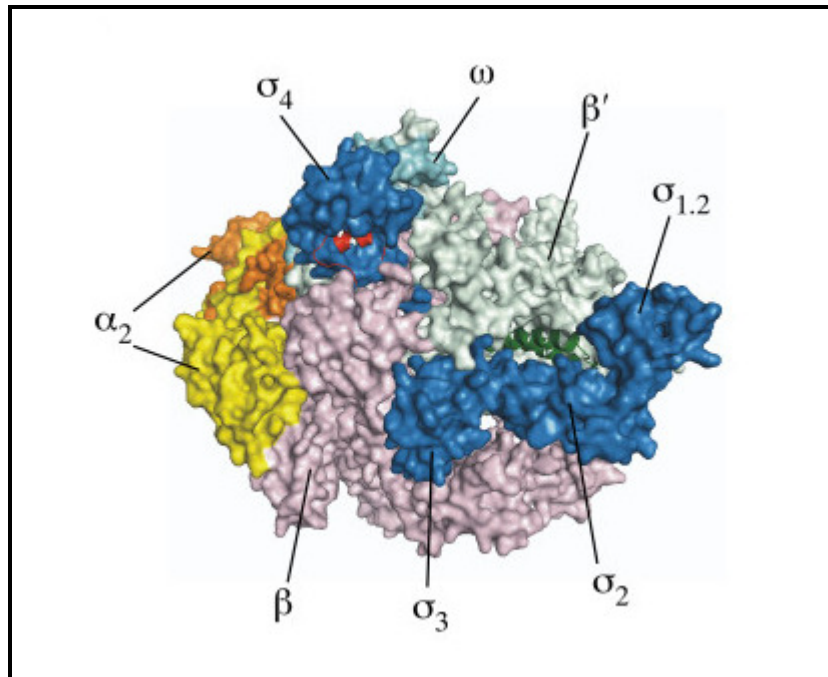


Figura 1.1: Holoenzima RNAP procariótica. As subunidades β (lilás), β' (verde claro), α_2 (amarelo e laranja) sem os seus domínios C-terminais, ω (ciano) e σ (azul escuro) estão representadas. Os domínios $\sigma_{1.2}$, σ_2 , σ_3 and σ_4 do fator sigma também foram identificados. **TRADUZIDO E ADAPTADO:** Geiduschek & Kassavetis, 2010.

Uma vez que essas proteínas geralmente apresentam uma preferência por promotores específicos, a combinação de várias delas com a RNAP se torna uma maneira eficaz de modular perfis transcricionais (Rodrigue *et al.*, 2006), modificando a expressão de grandes grupos de genes – reguloma – em resposta a diversos estímulos ambientais e, assim, causando mudanças extra e/ou intracelulares (Pátek & Nesvĕra, 2010) que estão de acordo com as necessidades fisiológicas do microrganismo em questão (Manganelli *et al.*, 2004). Em alguns casos, os genes que constituem um dado reguloma possuem uma função primária claramente definida, como os genes regulados pelos fatores sigma de esporulação em *Bacillus subtilis* e, em outros casos, esses genes podem contribuir para múltiplas

funções, como os genes expressos na fase estacionária do crescimento bacteriano e os genes de resposta geral ao estresse que são regulados pelo fator sigma alternativo σ^B de *Listeria monocytogenes* (Kazmierczak *et al.*, 2005).

Além disso, no caso particular de microrganismos patogênicos, esse mecanismo permite uma infecção bem sucedida por meio da expressão de genes de virulência e de genes associados à virulência, sendo, os primeiros, aqueles genes que codificam proteínas cujas funções são essenciais para que a bactéria seja capaz de estabelecer efetivamente uma infecção no organismo hospedeiro e, os últimos, aqueles genes que podem contribuir para a sobrevivência da bactéria no meio ambiente ou dentro do hospedeiro (Kazmierczak *et al.*, 2005).

Na verdade, sabe-se que os organismos procariotos, principalmente aqueles de crescimento rápido, possuem tipicamente um fator sigma primário que é responsável pela transcrição de genes necessários para a viabilidade celular – genes *housekeeping* – e, por isso, são considerados essenciais para a sobrevivência do microrganismo. Ademais, os genomas bacterianos codificam um número variável de fatores sigma alternativos não essenciais que reconhecem promotores de genes que precisam ser ativados em resposta a estímulos específicos (Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nesvĕra, 2010) como em várias condições de estresse, no caso de escassez de nutrientes, durante a fase estacionária de crescimento (Pátek & Nesvĕra, 2010) ou enquanto a bactéria passa por diferenciações morfológicas (Helmann, 2002).

Sabe-se, também, que o número de fatores sigma de um organismo procarioto pode variar de dois, como em *Streptomyces pyogenes*, que é uma bactéria Gram-positiva cujo habitat se restringe à orofaringe humana; a mais de 60, como em *Streptomyces coelicolor*, que também é uma bactéria Gram-positiva cujo habitat, ao contrário do de *S. pyogenes*, é altamente variável em termos de nutrientes, de estresses e da flora microbiana competidora. Além do mais, tirando o fato de que, em geral, o número de fatores sigma de um microrganismo aumenta proporcionalmente ao tamanho do seu genoma, as bactérias que são capazes de sofrer diferenciação, como aquelas produtoras de esporos, tendem a apresentar uma maior proporção de fatores sigma alternativos por tamanho de genoma do que aquelas que são patógenos obrigatórios ou comensais (Sachdeva *et al.*, 2009).

Desse modo, pode-se concluir que o número de fatores sigma alternativos de uma bactéria é, geralmente, correlacionado com a variabilidade dos ambientes encontrados por este microrganismo ao longo de sua vida (Sachdeva *et al.*, 2009). Ademais, é possível

afirmar que as bactérias fazem uso de fatores sigma alternativos para regular uma gama de processos fisiológicos e, assim, é possível dizer que tais fatores são críticos tanto para a fisiologia quanto para a patogenicidade desses microrganismos. Além disso, os fatores sigma apresentam uma biologia interessante e de aspectos desafiadores uma vez que, juntos, fazem parte de uma rede regulatória bastante complexa (Rodrigue *et al.*, 2006).

1.3.2. Classificação

Os fatores sigma bacterianos podem ser divididos em duas famílias estrutural, funcional e filogeneticamente distintas denominadas família do σ^{54} e família do σ^{70} (Manganelli *et al.*, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2005; Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nesvĕra, 2010). Os fatores da família do σ^{54} , os quais pertencem a essa família devido a sua similaridade com o fator sigma de 54 kDa responsável pela regulação do metabolismo de nitrogênio em *Escherichia coli*, necessitam tanto de ATP quanto da ação de um acentuador para serem capazes de exercer a sua função. Além disso, eles são considerados relativamente raros (Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nesvĕra, 2010) uma vez que não possuem representantes em nenhuma bactéria Gram-positiva cujo genoma apresenta alto conteúdo de G+C e nem em nenhuma cianobactéria. Por outro lado, os fatores sigma da família do σ^{70} , os quais pertencem a essa família devido a sua similaridade com o fator sigma primário de 70 kDa também de *E. coli*, podem ser encontrados em todas as espécies de bactérias (Sachdeva *et al.*, 2009). Ademais, a família do σ^{70} inclui o fator sigma primário – que em bactérias Gram-positivas é chamado de σ^A – e os fatores sigma alternativos relacionados a ele, os quais podem, ainda, ser classificados de acordo com os processos fisiológicos por eles controlados (Kazmierczak *et al.*, 2005).

Geralmente, o agrupamento dos fatores sigma de acordo com as suas funções correlaciona-se com as relações filogenéticas entre as suas estruturas protéicas (Kazmierczak *et al.*, 2005) e, no que diz respeito a esse tipo de classificação, é possível dizer que os fatores sigma que compõem a família do σ^{70} são proteínas modulares (Pátek & Nesvĕra, 2010) consistidas em até quatro regiões conservadas (Rodrigue *et al.*, 2006; Pátek & Nesvĕra, 2010), as quais podem ser divididas em sub-regiões (Figura 1.2).

A região 1 se situa na porção N-terminal da proteína, a qual compreende as sub-regiões 1.1 e 1.2, sendo, a primeira, a responsável por inibir a ligação dos fatores sigma dissociados da RNAP ao DNA. Já a região 2 consiste em quatro sub-regiões, sendo a sub-região 2.3 envolvida na formação da bolha de transcrição e, a sub-região 2.4 necessária para o reconhecimento da região -10 do promotor. A região 3, por sua vez, é composta pelas sub-

regiões 3.0, 3.1 e 3.2, sendo a sub-região 3.0 implicada no reconhecimento da extensão da região -10 do promotor. Finalmente, a região 4 abrange as sub-regiões 4.1 e 4.2, sendo que esta, além de interagir com vários ativadores transcricionais, é requerida para o reconhecimento da região -35 do promotor (Rodrigue *et al.*, 2006; Pátek & Nesvĕra, 2010). Além disso, todas as quatro regiões contribuem para a ligação do fator sigma ao cerne da RNAP (Rodrigue *et al.*, 2006).

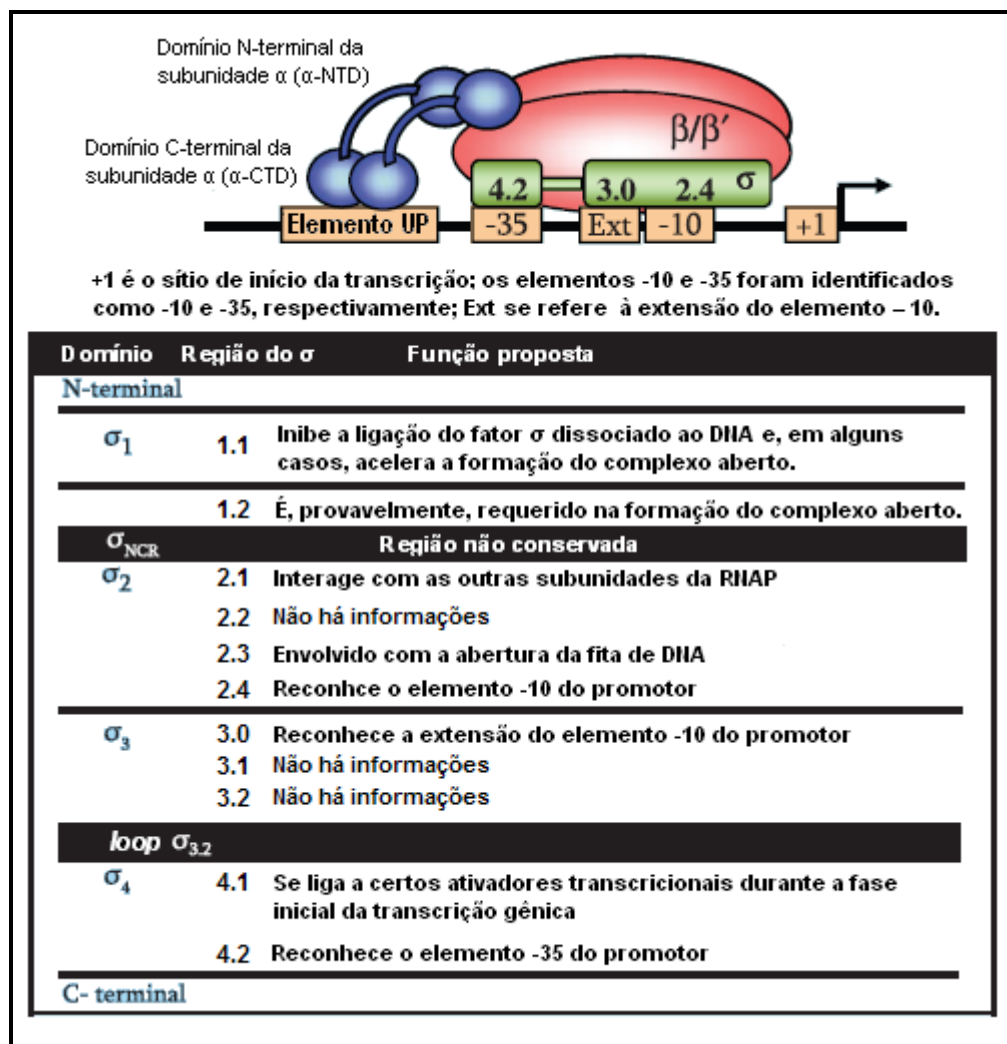


Figura 1.2: Reconhecimento de uma região promotora pela holoenzima RNA polimerase-σ⁷⁰. As subunidades α₂ (azul), β e β' (vermelho) do cerne da RNAP e a sua subunidade dissociável σ⁷⁰ (verde) estão identificadas. As regiões conservadas do σ⁷⁰ (regiões 1, 2, 3 e 4) e as suas respectivas funções propostas também estão listadas na tabela. **TRADUZIDO E ADAPTADO:** Sachdeva *et al.*, 2009.

Ademais, dependendo da sua estrutura e da sua função, os fatores sigma que pertencem à família do σ⁷⁰ ainda podem ser divididos em quatro grupos (Figura 1.3). O

primeiro grupo (grupo 1) é composto pelos “fatores sigma primários”, os quais apresentam todas as quatro regiões protéicas típicas dos fatores sigma (Figura 1.3) e são considerados essenciais para a sobrevivência do microrganismo uma vez que eles são os responsáveis pela transcrição da maioria dos genes *housekeeping* (Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009). Em *C. pseudotuberculosis*, esse grupo é representado pelo fator σ^A .

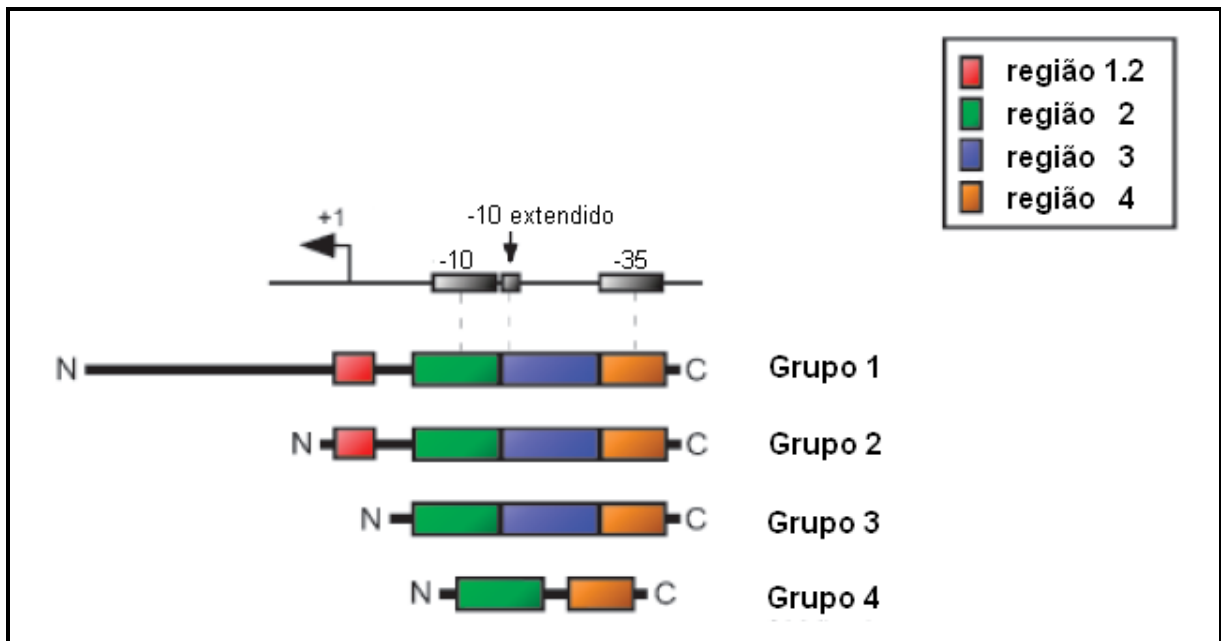


Figura 1.3: Representação da organização das regiões conservadas da estrutura dos fatores sigma. As linhas pontilhadas ligam uma região específica do fator sigma ao elemento promotor que ela reconhece. A seta maior indica o sítio de início da transcrição gênica. **TRADUZIDO E ADAPTADO:** Rodrigue *et al.*, 2006.

Já o segundo grupo (Grupo 2) é composto pelos “fatores sigma similares aos fatores sigma primários”, os quais, apesar de serem proximamente relacionados aos fatores sigma que compõem o Grupo 1, não são considerados essenciais para a sobrevivência bacteriana em condições normais. Além disso, eles não apresentam a maior parte da região conservada 1 em sua estrutura (Figura 1.3). Ademais, os fatores melhor caracterizados desse grupo estão envolvidos na transcrição de genes de resposta geral ao estresse e de genes requeridos para a sobrevivência bacteriana na fase estacionária de crescimento. No entanto, os fatores sigma do Grupo 2 são encontrados apenas em um número limitado de espécies bacterianas (*Proteobacteria*, *Cyanobacteria* e bactérias Gram-positivas com alto conteúdo de G+C no genoma) (Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009), sendo que, em *C. pseudotuberculosis*, esse grupo é representado pelo fator σ^B .

O terceiro grupo (Grupo 3), por sua vez, é composto por fatores sigma mais distantemente relacionados aos fatores sigma primários, os quais apresentam somente as regiões conservadas 2, 3 e 4 em sua estrutura (Figura 1.3). Além disso, os fatores desse grupo estão envolvidos na transcrição de genes como aqueles necessários para a resposta ao choque térmico, para a esporulação e para a biossíntese flagelar (Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009). Contudo, *C. pseudotuberculosis* não possui nenhum representante desse grupo.

Por último, o quarto grupo (Grupo 4), considerado o maior e mais heterogêneo dentre os quatro grupos que compõem a família do σ^{70} , é composto pelos “fatores σ^{ECF} ” (do inglês, *Extracytoplasmic Function*), os quais apresentam apenas as regiões conservadas 2 e 4 em sua estrutura (Figura 1.3). Esses fatores contribuem para o controle da expressão de genes cujos produtos exercem uma variedade de funções em resposta a sinais extracelulares específicos provenientes do ambiente em que a bactéria se encontra, como a presença de proteínas desnaturadas ou de moléculas tóxicas, mudanças na osmolalidade ou na pressão barométrica, a limitação de nutrientes e os estresses oxidativo e de superfície. Além disso, vários fatores desse grupo estão envolvidos na regulação de componentes importantes para a virulência de bactérias patogênicas (Tabela 1.1) (Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009). Em *C. pseudotuberculosis*, os fatores σ^{ECF} são representados pelos fatores σ^C , σ^D , σ^E , σ^H , σ^K e σ^M .

Tabela 1.1: Fatores sigma alternativos envolvidos na virulência de diferentes bactérias patogênicas. **TRADUZIDO E ADAPTADO:** Kazmierczak *et al.*, 2005.

FATOR SIGMA (Família/Classe)	ESPÉCIE BACTERIANA
Família σ^{70}	
Resposta geral ao estresse	
σ^B	<i>B. anthracis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
σ^S	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> var. Typhimurium, <i>S. enterica</i> var. Typhi
σ^F	<i>M. tuberculosis</i>
σ^{ECF}	
RpoE	<i>H. influenzae</i> , <i>S. enterica</i> var. Typhimurium, <i>V. cholerae</i>
AlgU; PvdS; Fpvl	<i>P. aeruginosa</i>
σ^C ; σ^D ; σ^E ; σ^H	<i>M. tuberculosis</i>
HrpL	<i>Erwinia</i> spp., <i>P. syringae</i>
Família σ^{54}	
σ^N	<i>C. jejuni</i> , <i>H. pylori</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. syringae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>

1.3.3. Fator sigma alternativo σ^H

O fator σ^H , um representante dos fatores σ^{ECF} , está geralmente envolvido na regulação de genes como o seu próprio gene estrutural e os genes que codificam outros fatores sigma, proteínas que atuam no reparo do DNA, proteínas de resposta geral ao estresse, enzimas envolvidas no metabolismo de tióis – como as tiorredoxinas e as tiorredoxinas redutases, enzimas envolvidas na biossíntese de cisteína e de molibdopterina, entre outros (Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006).

Em *M. tuberculosis*, uma das espécies bacterianas do Grupo CMN, o fator σ^H parece não exercer nenhum papel na fisiologia dessa bactéria quando ela é cultivada em condições normais (Manganelli *et al.*, 2002). Entretanto, o gene *sigH* tem os níveis da sua transcrição aumentados após a submissão desse microrganismo aos estresses térmico (aumento da temperatura) e oxidativo (exposição à diamida, a H_2O_2 e ao hidróxido de cumeno) e durante

a infecção de macrófagos *in vitro* (Raman *et al.*, 2001; Manganeli *et al.*, 2002; 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009).

Ademais, uma linhagem mutante $\Delta sigH$ de *M. tuberculosis*, apesar de ter crescido nas mesmas proporções, não foi capaz de induzir, em camundongos, a formação de granulomas do mesmo modo que a linhagem tipo-selvagem, causando, aquela, granulomas menores e menos abundantes, o que indica, por sua vez, que a linhagem deficiente para o fator σ^H apresentou uma histopatologia reduzida. Outro dado interessante é que essa linhagem também levou mais tempo para matar os camundongos infectados (Rodrigue *et al.*, 2006).

Em *C. glutamicum*, outra espécie bacteriana do Grupo CMN, foi demonstrado experimentalmente que o fator σ^H é o responsável, direto ou indireto, pela regulação da expressão de mais de 65 genes (Figura 1.4) (disponível em <<http://www.coryneregnet.de>>. Último acesso: 28/06/2011), dentre os quais são encontrados genes que atuam na resposta desse microrganismo aos estresses térmico e oxidativo. Além disso, curiosamente, esse fator está envolvido na regulação da transcrição dos genes *sigB*, *sigE*, *sigH* e *sigM* – os quais codificam fatores sigma alternativos – e dos genes *hspR*, *clgR*, *sufR*, *whcA* e *whcE* – os quais codificam outros reguladores de resposta ao estresse. Esses dados, portanto, sugerem que o fator σ^H ocupa uma posição central na rede regulatória dos fatores sigma, sendo, conseqüentemente, uma peça chave na resposta de *C. glutamicum* a várias condições de estresse ambiental (Pátek & Nesvĕra, 2010).

Desse modo, as informações aqui apresentadas, o fato de que o gene *sigH* é encontrado em todas as espécies do gênero *Corynebacterium* cujo genoma já foi seqüenciado (Tabela 1.2) e a sua alta conservação (62-88%) nas corinebactérias e nas micobactérias sustentam a idéia de que o fator σ^H é, sim, um regulador global da expressão gênica (Pátek & Nesvĕra, 2010).

Tabela 1.2: Genes codificadores de fatores sigma em corinebactérias.^a **TRADUZIDO E ADAPTADO:** Pátek & NesvĚra, 2010.

Espécie	Gene ^b										Nº de fatores σ^{ECF}
	<i>sigA</i>	<i>sigB</i>	<i>sigC</i>	<i>sigD</i>	<i>sigE^c</i>	<i>sigH^c</i>	<i>sigJ</i>	<i>sigK^c</i>	<i>sigM</i>	<i>sigW</i>	
<i>C. glutamicum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	5
<i>C. efficiens</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	5
<i>C. aurimucosum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	7
<i>C. diptheriae</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	7
<i>C. jeikeium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	7
<i>C. kroppenstedtii</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	5
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	6
<i>C. urealyticum</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	4
<i>C. accolens</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	6
<i>C. ammoniagenes</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	6
<i>C. amycolatum</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	5
<i>C. genitalium</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	7
<i>C. glucuronolyticum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	5
<i>C. lipophiloflavum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	6
<i>C. matruchotii</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	7
<i>C. pseudogenitalium</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	5
<i>C. resistens</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	7
<i>C. striatum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	7
<i>C. tuberculostearicum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	5

^a: Os dados foram compilados a partir das seqüências genômicas disponíveis no banco de dados do NCBI.

^b: +, presença do gene; -, ausência do gene.

^c: Os genes codificadores dos fatores anti-sigma putativos específicos para os fatores σ^C , σ^H e σ^K , respectivamente, estão localizados *downstream* dos genes *sigE*, *sigH* e *sigK* em todas as espécies citadas.

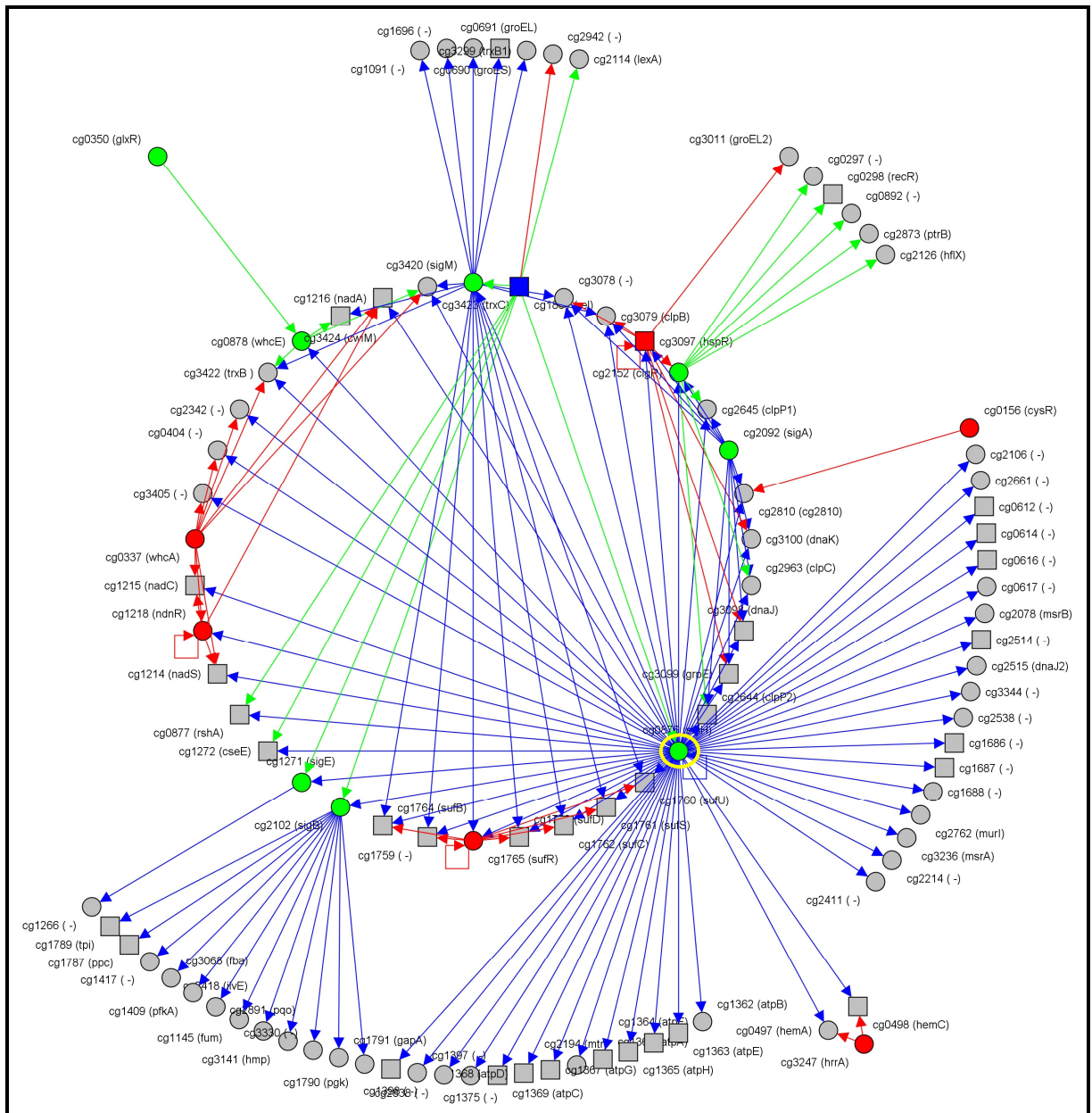


Figura 1.4: Rede regulatória do fator σ^H de *C. glutamicum*. Os círculos cinza representam os genes que são precedidos por sítios de ligação para reguladores transcricionais; os quadrados cinza representam os genes contidos em operons que não são precedidos por sítios de ligação para reguladores transcricionais; os círculos e os quadrados vermelhos representam repressores transcricionais; os círculos verdes representam ativadores transcricionais; os quadrados azuis representam reguladores transcricionais com dupla função; as setas vermelhas representam interações regulatórias repressivas; as setas azuis representam interações regulatórias ativadoras; as setas verdes representam as interações com os fatores sigma. O fator sigma H encontra-se dentro do círculo amarelo. **ADAPTADO:** <<http://www.coryneregnet.de>>. Último acesso: 28/06/2011

1.3.3.1. Fator sigma alternativo σ^H de *C. pseudotuberculosis*

O fator σ^H de *C. pseudotuberculosis* é codificado por um gene de 672 pb denominado *sigH*. Este faz parte de um operon no qual se encontra *upstream* do gene *rshA*, o qual, por sua vez, codifica o fator anti- σ^H (Figura 1.5). Ademais, pode-se dizer que a sequência de nucleotídeos do gene *sigH* (Figura 1.6) é idêntica em todas as linhagens de *C. pseudotuberculosis* cujo genoma já foi seqüenciado (Figura 1.7) (Silva *et al.*, 2011), incluindo a linhagem PAT10 – proveniente da Argentina – que ainda não teve a sua sequência genômica depositada no NCBI, o que mostra a sua alta conservação nessa espécie bacteriana.

Contudo, ainda se sabe muito pouco sobre o papel do fator σ^H na fisiologia de *C. pseudotuberculosis*, tendo sido sugerida, por Castro (2009), a sua atuação na resposta ao estresse oxidativo uma vez que a expressão do gene *sigH* apresentou uma tendência a aumentar após 15 minutos de exposição da linhagem 1002 selvagem ao peróxido de hidrogênio (40mM), o que vem a ocorrer de maneira significativa após 60 minutos de exposição ao mesmo agente causador de estresse. Além disso, também foi demonstrado que o gene *sigH* teve a sua expressão altamente induzida já no primeiro tempo experimental (15 minutos) após a exposição da mesma linhagem bacteriana à plumbagina (15 μ M) (Castro, 2009).

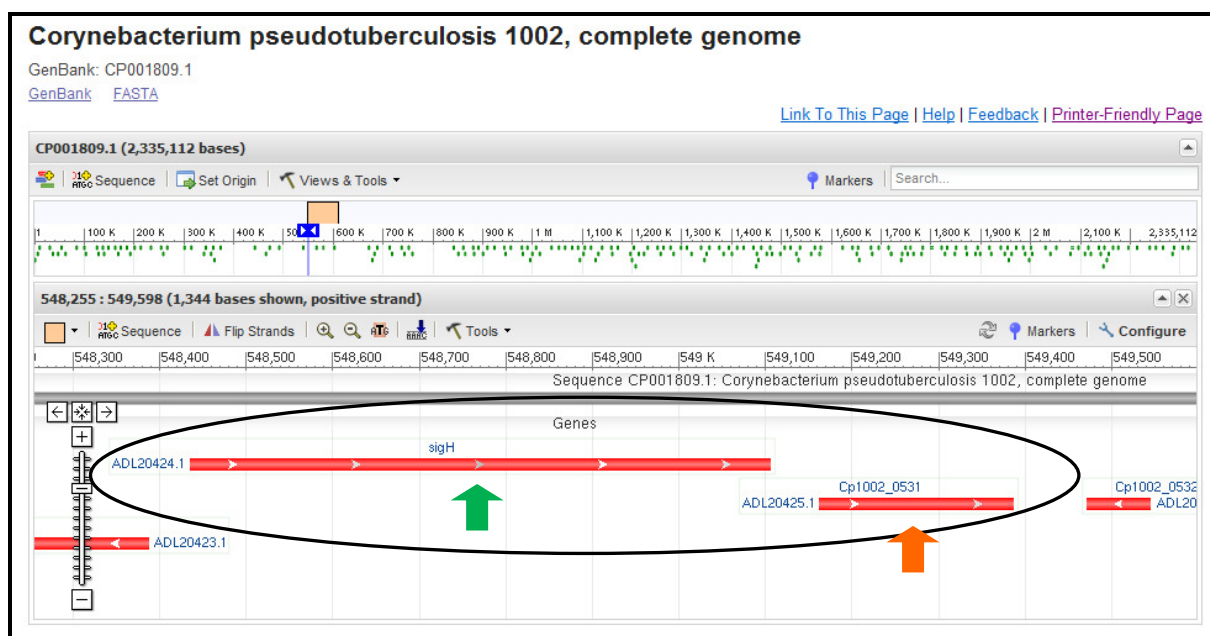


Figura 1.5: Representação do contexto genômico do gene *sigH* de *C. pseudotuberculosis*. O operon que abrange os genes *sigH* e *rshA* encontra-se circulado. A seta verde indica o gene *sigH*, que codifica o fator σ^H , e a seta laranja indica o gene *rshA*, que codifica o fator anti- σ^H .
ADAPTADO: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/302329714?report=graph&from=548450&to=549121#>>. Último acesso: 28/06/2011.

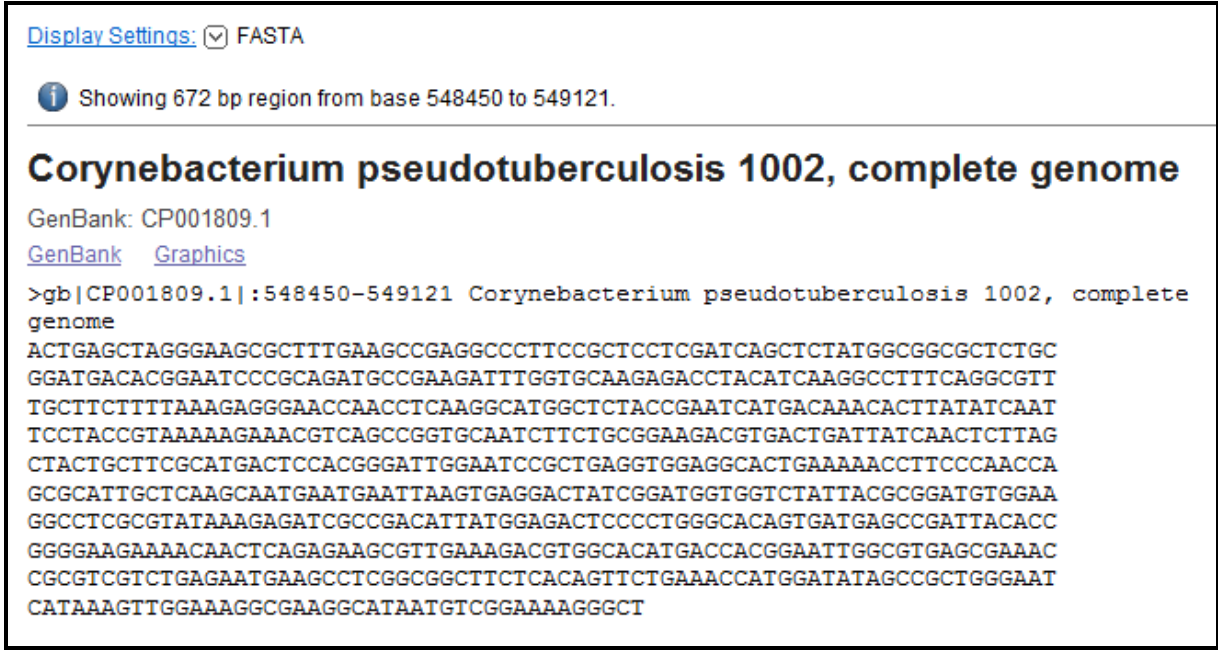


Figura 1.6: Seqüência de nucleotídeos do gene *sigH* de *C. pseudotuberculosis*.
ADAPTADO: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/302329714?report=fasta&from=548450&to=549121>>.
 Último acesso: 28/06/2011.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002251.1	Corynebacterium pseudotuberculosis I19, complete genome	1240	1240	99%	0.0	100%	
CP001809.1	Corynebacterium pseudotuberculosis 1002, complete genome	1240	1240	99%	0.0	100%	
CP001829.1	Corynebacterium pseudotuberculosis C231, complete genome	1240	1240	99%	0.0	100%	
CP002097.1	Corynebacterium pseudotuberculosis FRC41, complete genome	1240	1240	99%	0.0	100%	

Figura 1.7: Panorama do resultado de similaridade obtido para a seqüência do gene *sigH* de *C. pseudotuberculosis*, utilizando a ferramenta Blastn. O quadro mostra apenas os resultados obtidos para as linhagens de *C. pseudotuberculosis* cuja seqüência genômica foi depositada no NCBI.

1.4. Regulação pós-traducional dos fatores sigma bacterianos

Um dos requisitos para que a expressão gênica bacteriana seja efetiva é que ela seja bem orquestrada por meio da modulação correta tanto da atividade quanto dos níveis dos seus fatores sigma alternativos (Sachdeva *et al.*, 2009). Desse modo, a regulação desses fatores também pode ser considerada uma peça chave para a ativação das respostas adequadas desses microrganismos a estímulos externos específicos (Pátek & Nervěra, 2010).

Os fatores sigma alternativos são regulados nos níveis transcricional, traducional e pós-traducional (Helmann, 1999), sendo que a última pode ser feita por, pelo menos, dois tipos de reguladores: (i) os fatores anti- σ , que se ligam ao seu fator sigma cognato e, assim, impedem a interação deste com o cerne da RNAP e (ii) os “apropriadores”, que alteram a atividade de uma holoenzima RNAP específica (Campbell *et al.*, 2008). No entanto, ainda podemos adicionar a essa lista, como mecanismo regulador, a regulação dos próprios fatores anti- σ , o que pode ocorrer através da sua secreção para o ambiente extracelular, da sua ligação a um fator anti-anti- σ , sua interação com proteínas extracitoplasmáticas ou com pequenas moléculas efetoras ou da sua inativação pela oxidação induzida por algum estresse (Helmann, 1999; Gaskell *et al.*, 2007).

1.4.1. Fatores anti- σ bacterianos

Os fatores anti- σ atuam através de um sistema de “troca de parceiros” em que interações proteína-proteína são controladas por meio de diversos mecanismos, como a fosforilação e a desfosforilação de substratos (Sachdeva *et al.*, 2009). Especificamente, o resultado da ação de um fator anti- σ é o impedimento da associação de um fator sigma com o cerne da RNAP, inibindo a influência do último nos perfis de expressão gênica até que o estímulo apropriado seja percebido pela bactéria (Figura 1.8) (Rodrigue *et al.*, 2006).

Até o ano de 2009, haviam sido identificados cinco fatores anti- σ em *M. tuberculosis*. Destes, o “regulador do sigma E” A (RseA), o “regulador do sigma H” A (RshA) e o “regulador do sigma L” A (RslA) fazem parte da família dos fatores anti- σ associados ao zinco (ZAS – do inglês, *Zinc-Associated Anti-Sigma Factor*). Além disso, essas três proteínas contêm um motivo HXXXCXXC, o qual é encontrado em vários fatores anti- σ . Outra característica compartilhada por esses três fatores é o fato de que os seus genes estruturais se encontram *downstream* do gene que codifica o seu fator sigma cognato (Rodrigue *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Sachdeva *et al.*, 2009).

Como dito anteriormente, o fator σ^H de *M. tuberculosis*, assim como o seu fator sigma homólogo σ^R de *S. coelicolor*, é regulado pelo seu fator anti- σ cognato – RshA. Normalmente, esse fator anti- σ interage com o fator σ^H , sendo que essa interação é interrompida uma vez que a bactéria é exposta aos estresses térmico (aumento da temperatura) e oxidativo (Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009).

O RshA atua como um sensor de estresse, o qual inibe a transcrição gênica dependente do fator σ^H , por meio do impedimento da associação deste à RNAP, quando o ambiente intracelular encontra-se num estado reduzido (Rodrigue *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Sachdeva *et al.*, 2009). No entanto, diante de condições oxidantes, podem se formar pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína específicos da estrutura protéica do fator anti- σ , resultando numa mudança de conformação que leva à liberação do fator sigma (Rodrigue *et al.*, 2006). A partir desse momento, o fator σ^H encontra-se livre para se ligar ao cerne da RNAP e, conseqüentemente, induzir a transcrição dos genes que compõem o seu reguloma, incluindo o seu próprio gene estrutural. Desse modo, a auto-regulação do promotor do gene *sigH* aumenta os níveis desse fator na célula bacteriana, o que, por sua vez, resulta numa indução aumentada da transcrição dos genes do seu reguloma. Essa situação é mantida até que o estado de equilíbrio redox intracelular seja restabelecido, sendo, assim, possível a interrupção da atividade do fator σ^H pelo RshA (Park *et al.*, 2008; Sachdeva *et al.*, 2009).

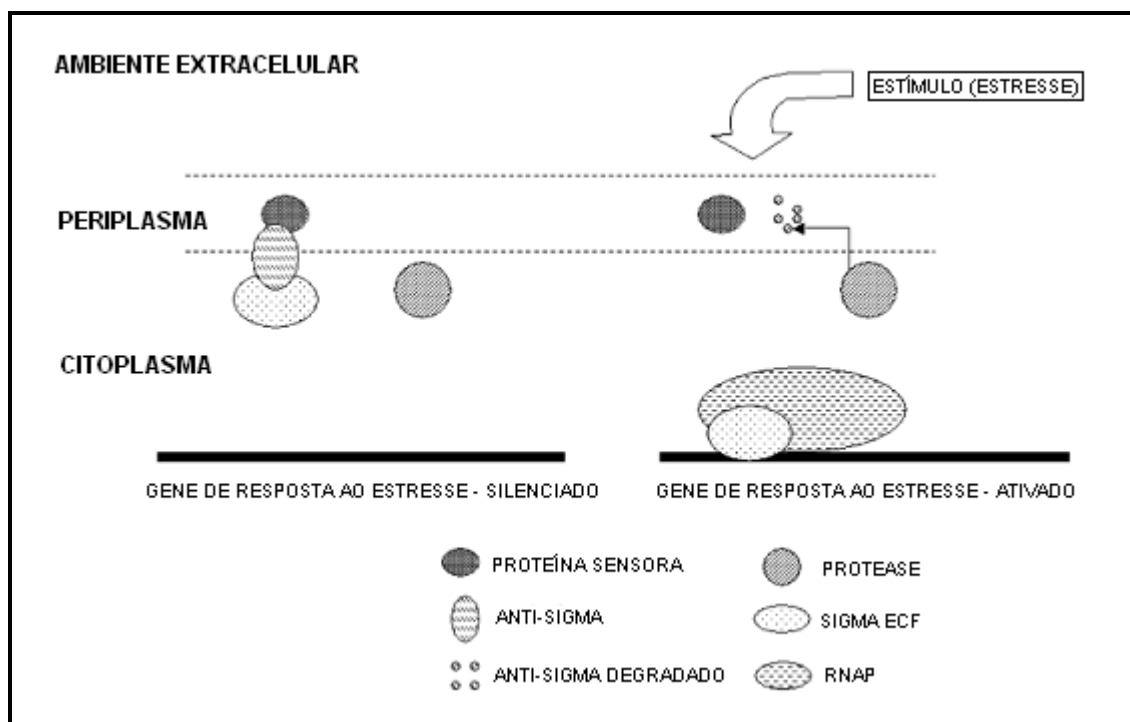


Figura 1.8: Representação simplificada da interação entre um fator σ^{ECF} e o seu fator anti- σ . (1) A porção N-terminal do fator anti- σ , a qual se localiza no citoplasma, interage diretamente com o seu respectivo fator sigma. Já a porção C-terminal do fator anti- σ se projeta para o periplasma, onde interage com a proteína sensora. (2) Estímulos específicos são percebidos pela proteína sensora, levando à dissociação entre o fator sigma e o seu fator anti- σ . Isso, por sua vez, leva à ativação de proteases as quais degradam o fator anti- σ . Desse modo, a inibição da atividade do fator sigma é anulada e os genes que compõem o seu reguloma são transcritos. **TRADUZIDO E ADAPTADO:** Bashyam & Hasnain, 2004.

1.4.2. Fator anti- σ^H

O fator anti- σ^H de *C. pseudotuberculosis* é codificado por um gene de 225 pb denominado *rshA*. Este, como dito anteriormente, faz parte de um operon no qual se encontra *downstream* do gene *sigH*, que codifica o fator σ^H (Figura 1.5). Além disso, pode-se dizer que a sequência de nucleotídeos do gene *rshA* (Figura 1.9), assim como a sequência do gene *sigH*, é idêntica em todas as linhagens de *C. pseudotuberculosis* cuja sequência genômica já foi depositada no NCBI (Figura 1.10) (Silva *et al.*, 2011), o que também mostra a sua alta conservação nessa espécie bacteriana.

Display Settings: ☒ FASTA

Showing 225 bp region from base 549163 to 549387.

Corynebacterium pseudotuberculosis 1002, complete genome

GenBank: CP001809.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gb|CP001809.1|:549163-549387 Corynebacterium pseudotuberculosis 1002, complete genome
ATGTATGCGCTTTTAGATCGGGAACCTTACTGAGGTTGAATGTGCGCGACTCAACGCACATATCGCTCAAT
GCCCGGAATGCGCGGAAATGATCGCGGCGGAGGAAAGCCTGAGACGTTTGCTAAAGAAGTGCTGTTGCGG
GCCGGCTCCTGCGAGTTTGCGGGAAAAGATTCTTATTCTATTGAGATTGAGCGGACTACTATTATCACT
CAACGCGAATTTTAG
```

Figura 1.9: Sequência de nucleotídeos do gene *rshA* de *C. pseudotuberculosis*.

ADAPTADO: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/302329714?report=fasta&from=549163&to=549387>>.

Último acesso: 29/06/2011.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP002251.1	Corynebacterium pseudotuberculosis I19, complete genome	407	407	100%	2e-110	100%	
CP001809.1	Corynebacterium pseudotuberculosis 1002, complete genome	407	407	100%	2e-110	100%	
CP001829.1	Corynebacterium pseudotuberculosis C231, complete genome	407	407	100%	2e-110	100%	
CP002097.1	Corynebacterium pseudotuberculosis FRC41, complete genome	407	407	100%	2e-110	100%	

Figura 1.10: Panorama do resultado de similaridade obtido para a sequência do gene *rshA* de *C. pseudotuberculosis*, utilizando a ferramenta Blastn.

1.5. Potencial terapêutico dos fatores sigma bacterianos

Algumas linhagens bacterianas patogênicas deficientes para certos fatores sigma, mesmo apresentando taxas de crescimento normais durante experimentos *in vivo*, induzem a sobrevivência prolongada e a progressão atenuada da doença em cobaias

imunocompetentes. Essas linhagens, chamadas de mutantes *imp*, as quais persistem no organismo hospedeiro em altos níveis de infecção e, ao mesmo tempo, estimulam, nestes, uma resposta imune que não vem a resultar em mudanças histopatológicas danosas, podem vir a se tornarem bons candidatos vacinais (Sachdeva *et al.*, 2009). Desse modo, podemos citar como exemplos de mutantes *imp* as linhagens $\Delta sigC$, $\Delta sigD$, $\Delta sigE$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigH$ de *M. tuberculosis*. Além disso, uma vez que os fatores sigma modulam a resposta bacteriana a certos estresses ambientais, como a presença de antibióticos no meio ambiente, esses reguladores são possíveis alvos para a atuação de novas drogas (Bashyam & Hasnain, 2004).

1.6. Justificativa de realização do trabalho

Além de ser uma doença de distribuição mundial, a LC é uma das principais causas de perdas econômicas para as regiões que praticam a ovinocaprinocultura (Baird & Fontaine, 2007) e, apesar da patogenia dessa enfermidade ser relativamente bem entendida (Dorella *et al.*, 2006b; Pacheco, 2010), são necessários maiores estudos relacionados às bases moleculares da virulência do seu agente etiológico, *C. pseudotuberculosis*.

Depois do Projeto Genoma dessa espécie bacteriana, o qual foi desenvolvido pela Rede Genoma de Minas Gerais e Rede Paraense de Genômica e Proteômica, ter sido finalizado, foi possível identificar a presença de sete fatores σ alternativos no genoma deste organismo patogênico e, dentre eles, o fator sigma alternativo σ^H (Pacheco, 2010).

Assim, na busca por novos determinantes de virulência de *C. pseudotuberculosis*, bem como com o intuito de contribuir para uma melhor compreensão da regulação geral da expressão gênica e, conseqüentemente, da fisiologia dessa bactéria, o nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo dos fatores sigma alternativos da RNAP.

Neste contexto, então, o presente trabalho se dedicou ao estudo do papel do fator sigma alternativo σ^H na resposta de *C. pseudotuberculosis* a várias condições de estresse ambiental uma vez que esse fator parece exercer um papel central na regulação de genes que atuam na resposta adaptativa de outros microrganismos proximamente relacionados, como *M. tuberculosis* e *C. glutamicum*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel do fator sigma alternativo σ^H de *C. pseudotuberculosis* na resistência a alguns tipos de estresses ambientais, objetivando a melhor compreensão da regulação geral da expressão gênica desta bactéria.

2.2. Objetivos específicos

- Gerar a linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* através de um evento de recombinação homóloga simples;
- Comparar a resistência da linhagem tipo-selvagem 1002 e de seu respectivo mutante ($\Delta sigH$) ao estresse ácido *in vitro*;
- Comparar a resistência da linhagem tipo-selvagem 1002 e de seu respectivo mutante ($\Delta sigH$) ao estresse térmico *in vitro*;
- Comparar a resistência da linhagem tipo-selvagem 1002 e de seu respectivo mutante ($\Delta sigH$) ao estresse oxidativo *in vitro*;
- Comparar a resistência da linhagem tipo-selvagem 1002 e de seu respectivo mutante ($\Delta sigH$) ao estresse osmótico *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas e condições de cultivo

Foram utilizadas a linhagem tipo-selvagem 1002 e a linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*, as quais foram cultivadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI) ou em meio BHI sólido (1,5% de ágar bacteriológico), acrescidos ou não do antibiótico canamicina (25 µg/mL), a 37 °C por 48-72 horas.

No caso dos experimentos de resistência ao estresse, as duas linhagens foram cultivadas em caldo BHI, acrescidos ou não do antibiótico canamicina (25 µg/mL), sob agitação (140 rpm) ou não, a 37 °C (exceto nos experimentos de resistência ao estresse térmico) por 48-72 horas.

Além disso, para os procedimentos de clonagem, foi utilizada a linhagem Top10 de *E. coli*. Esta foi cultivada em caldo Luria-Bertani (LB) ou em meio LB sólido (1,5% de ágar bacteriológico), acrescidos ou não de canamicina (50 µg/mL), a 37 °C por 18-24 horas.

3.2. Manipulação do DNA

Todos os ensaios de biologia molecular empregados na manipulação de DNA foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook *et al.*, 2001) e/ou com as recomendações dos fabricantes de certos produtos, podendo esses procedimentos apresentar modificações. Estas, por sua vez, foram especificadas quando necessário.

Ademais, a qualidade dos produtos obtidos, incluindo a concentração e a pureza do DNA, foi estimada tanto por meio da observação da sua resolução eletroforética em gel de agarose a 1% quanto por meio de leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Além disso, as seqüências de nucleotídeos dos insertos foram confirmadas através de seqüenciamento (Sanger *et al.*, 1977), as quais foram, então, analisadas com o auxílio de programas computacionais padrão, como o BLAST (do inglês, Basic Local Alignment Search Tool), o qual se encontra disponível na página do NCBI (do inglês, National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.3. Resolução eletroforética

Todas as amostras de DNA foram resolvidas como descrito a seguir: foi adicionado, ao DNA, o mesmo volume de tampão da amostra (glicerol 50%; azul de bromofenol 0,20%;

TBE 2,5X), produzindo, assim, uma mistura. Esta foi homogeneizada e aplicada em gel de agarose a 1% contendo 3,5% do volume do gel de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em tampão TBE 0,5X (Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM pH 8,0 – 8,5; H₂O destilada q.s.p. 1L). As corridas foram, então, realizadas a 100 V por um período de aproximadamente 1 hora. A seguir, o DNA foi visualizado num fotodocumentador, no qual foi possível fotografar o gel – que se encontrava sobre um transluminador de luz ultravioleta (UV) cujo comprimento de onda era de 320 nm – por meio do sistema de documentação fotográfica Kodak Digital Science TM DC40 Camera (Kodak). Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram, então, estimados através da sua comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™).

3.4. Geração da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*

3.4.1. Extração de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* 1002

Primeiramente, foi feita a extração do DNA genômico da linhagem tipo-selvagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* do seguinte modo:

Inicialmente, foi feito um pré-inóculo dessa linhagem bacteriana em 30 mL de caldo BHI, o qual foi incubado a 37°C por 48 horas. Depois, essa cultura foi centrifugada a 4.000 rpm à temperatura ambiente por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, descartado e o precipitado foi suspenso em 600 µL da solução I (Tris-HCl pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; NaCl 5M; H₂O destilada q.s.p. 50 mL), sendo a mistura obtida transferida para um tubo com *beads* (VK01 ou VK05 (Bertin Technologies)). A seguir, com o auxílio do homogeneizador de amostras Precellys 24 (Bertin Technologies), a solução foi submetida a dois ciclos de homogeneização de 15 segundos a 6.500 rpm cada, havendo um intervalo de 30 segundos entre eles. Após esse procedimento, o volume do tubo foi completado com solução de fenol e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 7 minutos. Depois, a fase aquosa da mistura foi transferida para outro tubo para que fosse possível a adição de 1 mL de clorofórmio a ela. Essa nova mistura também foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 7 minutos. Novamente, a fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo para que pudessem ser adicionados a ela 2,5 vezes o seu volume de etanol etílico, 10% do seu volume de NaCl 5M ou de NaAc 3M e 1% também do seu volume de glicogênio 20 mg/mL. A seguir, essa mistura foi deixada em repouso a -80°C por 30 minutos para que o DNA presente nela fosse precipitado. Passado esse tempo, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado ao precipitado. Essa nova mistura foi, então, deixada em repouso a -20°C por 15 minutos. Depois, a mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante

foi descartado e o precipitado foi colocado numa temperatura de 60°C para secar. Por último, o precipitado, o qual continha o DNA genômico extraído, foi suspenso em 40 µL de água milli-Q esterilizada.

Além disso, uma alíquota de 2 µL do produto dessa extração foi submetida à resolução eletroforética (vide seção 3.3) para que a sua qualidade pudesse ser estimada.

3.4.2. Amplificação de uma região interna do gene *sigH*

Um fragmento de DNA de 502 pb que corresponde a uma região interna do gene *sigH* codificador do fator sigma alternativo σ^H foi amplificado, por meio do uso de iniciadores específicos (Tabela 3.1), a partir do DNA genômico da linhagem tipo-selvagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*.

Tabela 3.1: Iniciadores utilizados para a amplificação de um fragmento interno do gene *sigH*.

Alvo	Iniciador 5'-3'
<i>sigH</i>	sigH _i -F: TGCAAGAGACCTACATCAAGG
	sigH _i -R: GTTTCAGAACTGTGAGAAGCC

Essa reação de PCR, a qual apresentava um volume final de 25 µL, continha 0,5 µL de DNA (100 ng/µL); 5,0 µL do tampão 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 2,0 µL de MgCl₂ (25mM) (Promega); 1,0 µL de dNTP (10mM) (Promega); 0,5 µL de cada iniciador (100 pMoles/µL); 0,125 µL da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 15,37 µL de água milli-Q estéril.

Ademais, a amplificação, a qual foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos.

A seguir, uma alíquota de 2 µL do produto dessa amplificação foi submetida à resolução eletroforética (vide seção 3.3) para que a sua qualidade e o tamanho do fragmento amplificado pudessem ser estimados.

3.4.3. Clonagem do fragmento interno do gene *sigH* no sistema TOPO

O fragmento interno do gene *sigH* amplificado foi, então, ligado no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™) (Figura 3.1), sendo os procedimentos realizados conforme as instruções do fabricante.

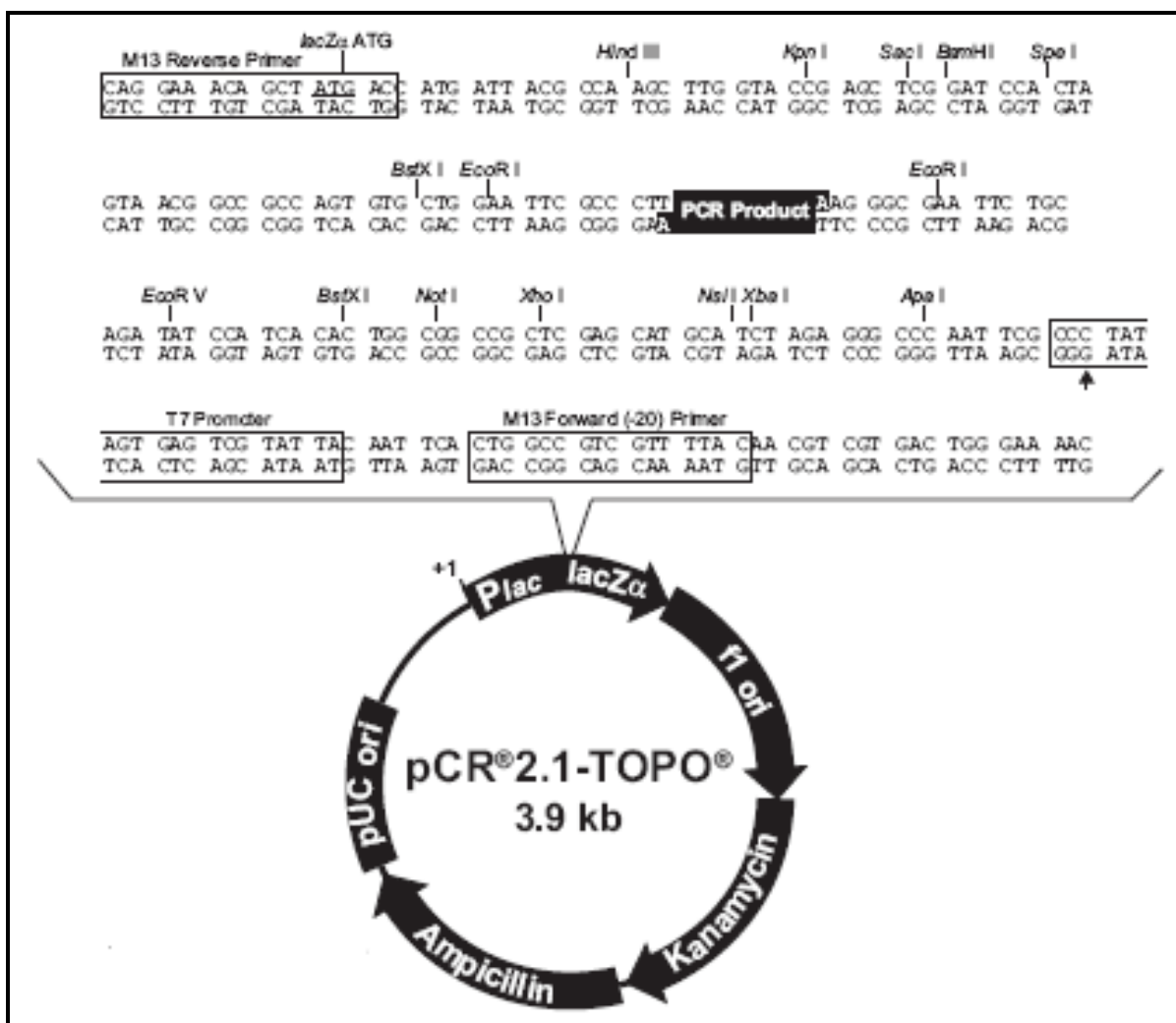


Figura 3.1: Representação esquemática do vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™), destacando-se o sítio de clonagem múltipla do mesmo. Os sítios das respectivas endonucleases de restrição estão indicados no local da clivagem. A seta indica o início da transcrição para a T7 polimerase. A sequência de anelamento dos iniciadores M13 *forward* e *reverse* estão destacados na figura. **FONTE:** TOPO TA Cloning® User Manual, Invitrogen™.

Resumidamente, essa reação de ligação, a qual apresentava um volume final de 6 µL, continha 2,0 µL do produto da amplificação; 1,0 µL do vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™); 1,0 µL da solução salina (Invitrogen™) diluída 4X e 2,0 µL de água milli-Q esterilizada.

Esses reagentes foram, então, misturados e deixados em repouso na temperatura ambiente por 30 minutos.

Após esse período, o produto da reação de ligação foi dialisado por meio da utilização de uma membrana Millipore com filtro de 0,025 μm , a qual foi colocada num recipiente com água destilada também por 30 minutos.

3.4.4. Produção de *E. coli* eletrocompetente

Inicialmente, foi feito um pré-inóculo de *E. coli* Top10 em 5 mL de caldo LB, o qual foi incubado a 140 rpm a 37°C por 18 horas. Passado esse tempo, uma alíquota de 3 mL dessa cultura foi adicionada a um recipiente com 300 mL de caldo LB, a qual, por sua vez, foi incubada a 140 rpm a 37°C. Ao atingir um valor de densidade óptica (DO_{600}) entre 0,2 e 0,3; essa cultura foi colocada num recipiente com gelo por 30 minutos a fim de se resfriar. Depois, a cultura foi dividida em seis alíquotas de 40 mL, as quais foram centrifugadas a 4.000 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi, então, descartado e foram adicionados 40 mL de glicerol 10% gelado estéril a cada um dos seis tubos que continham os precipitados. A mistura foi homogeneizada, centrifugada a 4.000 rpm a 4°C por 20 minutos e o seu sobrenadante foi descartado. Esse processo de lavagem foi repetido mais três vezes, sendo que, após a última lavagem, o precipitado resultante foi suspenso em 1 mL de glicerol 10% gelado estéril. Essa mistura foi, então, dividida em alíquotas de 100 μL para estocagem a -80°C.

Já para a análise da eficiência de transformação, uma das alíquotas de 100 μL da bactéria eletrocompetente foi colocada em repouso num recipiente com gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 μL do plasmídeo pUC19 (10 ng/ μL) ao tubo contendo as células bacterianas, o qual, por sua vez, foi colocado em repouso por mais 10 minutos. A mistura foi, então, transferida para uma cubeta de eletroporação (2 mm) (BioAgency) previamente resfriada. Depois, com o auxílio de um eletroporador GenePulser XCell™ Eletroporation System (Bio-RAD), a mistura foi submetida a um pulso elétrico de 250 V com capacitância de 25 μF e com resistência de 200 Ω . Após o pulso, foi adicionada uma alíquota de caldo LB a 37°C suficiente para completar o volume do tubo com as células eletroporadas para 1 mL. Estas, então, foram deixadas num banho-maria a 37°C por um período de 2 a 3 horas. Passado esse tempo, essa cultura foi diluída em múltiplos de 10, sendo as diluições plaqueadas, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em meio LB sólido acrescido do antibiótico ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$). As placas, por sua vez, foram incubadas a 37°C por 18 horas.

3.4.5. Transformação de *E. coli* Top10

A transformação foi realizada seguindo-se alguns dos mesmos passos descritos na seção 3.4.4 (avaliação da eficiência das células eletrocompetentes). Porém, pode-se dizer, resumidamente, que todo o volume do produto da reação de ligação (6 μ L) foi misturado com os 100 μ L presentes numa das alíquotas de células eletrocompetentes, sendo a mistura colocada em repouso num recipiente com gelo por 10 minutos. Para o controle negativo, foram adicionados 6 μ L de água milli-Q estéril ao invés dos plasmídeos construídos ao tubo contendo a bactéria. Após o pulso, também realizado com o auxílio do eletroporador GenePulser XCell™ Eletroporation System (Bio-RAD), foi adicionada uma alíquota de caldo LB a 37°C suficiente para completar o volume do tubo com as células eletroporadas para 1 mL. Estas, então, foram deixadas num banho-maria a 37°C por um período de 2 a 3 horas.

O processo de seleção dos transformantes consistiu no plaqueamento, com o auxílio de uma alça de Drigalski, de alíquotas de 200 μ L da cultura em meio LB sólido acrescido do antibiótico canamicina (50 μ g/mL). As placas foram, então, incubadas a 37°C por 18 horas, sendo que, após esse período, elas foram avaliadas quanto à presença ou à ausência de colônias de *E. coli* resistentes ao antibiótico em questão.

A etapa seguinte consistiu na seleção dos clones contidos nessas placas para que fosse possível proceder com a extração dos plasmídeos construídos e com a confirmação da presença do fragmento interno do gene *sigH* nestes.

3.4.6. Extração do DNA plasmidiano de *E. coli* em pequena escala

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de caldo LB acrescido do antibiótico canamicina (50 μ g/mL), as quais foram incubadas a 140 rpm a 37°C por 18 horas. Depois, uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi estocada a -80°C, utilizando-se glicerol 80% estéril na proporção de 1:1. O restante do inóculo, por sua vez, foi transferido para tubos de 2 mL para que fosse feita a extração de DNA plasmidiano desses clones pelo método de lise alcalina, descrito por Sambrook e colaboradores (2001) e com algumas modificações, como descrito a seguir: alíquotas de 4 mL de cada cultura foram centrifugadas a 13.000 rpm a temperatura ambiente por 7 minutos, sendo os sobrenadantes descartados e os precipitados suspensos em 200 μ L da solução I (sacarose 5M ou glicose 5M; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; água destilada esterilizada q.s.p. 10 mL). Após cinco minutos, foram adicionados 400 μ L da solução II (NaOH 0,2N; SDS 1%; água destilada esterilizada q.s.p. 5 mL) à mistura. Passados mais dois minutos, foram adicionados 100 μ L de clorofórmio e 300

mL da solução III (acetato de potássio 5M; 11,5 mL de ácido acético glacial; água destilada esterilizada q.s.p. 100 mL) e a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo para que pudessem ser adicionados a ele 2,5 vezes o seu volume de etanol etílico, 10% do seu volume de NaAc 3M e 1% também do seu volume de glicogênio 20 mg/mL. A seguir, essa mistura foi deixada em repouso a -80°C por 30 minutos para que o DNA presente nela fosse precipitado. Passado esse tempo, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado ao precipitado. Depois, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi colocado numa temperatura de 60°C para secar. Por último, o precipitado, o qual continha o DNA plasmidiano extraído, foi suspenso em 40 mL de água milli-Q esterilizada.

Quando necessário, o DNA foi tratado com 1 µL de RNase (100 µg/mL), sendo os tubos deixados em repouso no banho-maria a 37°C por 1 hora.

Além disso, uma alíquota de 2 µL do produto dessa extração foi submetida à resolução eletroforética (vide seção 3.3) para que a sua qualidade pudesse ser estimada.

3.4.7. Confirmação do evento de clonagem

3.4.7.1. Confirmação por PCR

Com o intuito de confirmar o evento de clonagem do fragmento interno do gene *sigH* no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™), foi feita uma reação de PCR para que, com o uso de iniciadores específicos (Tabela 3.1), o inserto pudesse ser amplificado.

Essa amplificação, a qual apresentava um volume final de 25 µL, continha 0,5 µL de DNA (100 ng/mL); 5,0 µL do tampão 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 2,0 µL de MgCl₂ (25mM) (Promega); 1,0 µL de dNTP (10mM) (Promega); 0,5 µL de cada iniciador (100 pMoles/µL); 0,125 µL da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 15,375 µL de água milli-Q estéril.

Ademais, a amplificação, a qual foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Além disso, uma alíquota de 2 µL do produto dessa amplificação foi submetida à resolução eletroforética (vide seção 3.3) para que a sua qualidade e o tamanho do fragmento amplificado pudessem ser estimados.

3.4.7.2. Confirmação por digestão enzimática

Também para confirmar a clonagem do fragmento interno do gene *sigH* no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™), este foi submetido à digestão enzimática com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante.

Resumidamente, a digestão, a qual tinha um volume final de 10 µL, continha 5 µL do produto da extração de DNA plasmidiano em pequena escala (100 ng/µL); 0,5 µL da enzima *EcoRI* (Invitrogen™); 1,0 µL do tampão REact3 (Invitrogen™) e 3,5 µL de água milli-Q estéril. Esses reagentes foram, então, misturados e deixados em repouso no banho-maria a 37°C por 2 horas.

Além disso, uma alíquota de 2 µL do produto dessa digestão enzimática foi submetido à resolução eletroforética (vide seção 3.3) para que a sua qualidade e o tamanho do fragmento liberado do plasmídeo pudessem ser estimados.

3.4.7.3. Confirmação por seqüenciamento

A seqüência de nucleotídeos do fragmento interno do gene *sigH* clonado no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™) foi confirmada através de seqüenciamento (Sanger et al., 1977). Esse procedimento, o qual foi feito com o auxílio do seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare), fez uso do kit “DYEnamic ET Dye Terminator” (GE Healthcare); 1,0 µL do iniciador M13 *forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') (10 pmol); 1,0 µL do iniciador M13 *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (10 pmol); 2,5 µL do produto da extração de DNA plasmidiano em pequena escala (100 ng/µL) e água milli-Q estéril q.s.p. 5 µL.

A seqüência de DNA obtida através do seqüenciamento foi, então, analisada por meio da utilização do programa computacional BLASTn (do inglês, *Nucleotide BLAST*), o qual se encontra disponível na página do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.4.8. Produção de *C. pseudotuberculosis* eletrocompetente

Depois de confirmado o evento de clonagem do fragmento interno do gene *sigH* no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™]), foi necessário confeccionar células de *C. pseudotuberculosis* eletrocompetentes para que fosse possível, então, proceder com a geração da linhagem mutante deficiente para o fator sigma alternativo σ^H .

Assim, inicialmente, foi feito um pré-inóculo de *C. pseudotuberculosis* 1002 em 240 mL de caldo BHI, o qual foi incubado a 37°C por 48 horas. Passado esse tempo, a cultura foi dividida em seis alíquotas de 40 mL, as quais foram deixadas em repouso num recipiente com gelo por 1 hora. Essas alíquotas foram, então, centrifugadas a 4.000 rpm a 4°C por 20 minutos e o seu sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 10 mL de glicerol 10% gelado estéril a um dos precipitados, que foi suspenso e transferido para um segundo tubo. O precipitado deste, por sua vez, foi suspenso e transferido para um terceiro tubo cujo precipitado também foi suspenso. No entanto, agora, o volume deste tubo foi completado para 40 mL por meio da adição de glicerol 10% gelado estéril, sendo essa mistura homogeneizada. Os três tubos restantes passaram pelo mesmo procedimento. Desse modo, os dois tubos restantes foram centrifugados a 4.000 rpm a 4°C por 20 minutos e o seu sobrenadante foi descartado. Depois, foram adicionados 30 mL de glicerol 10% gelado estéril a esses tubos, os quais tiveram os seus precipitados suspensos e centrifugados a 4.000 rpm a 4°C por 20 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados mais 10 mL de glicerol 10% gelado estéril aos tubos, que também tiveram os seus precipitados suspensos e centrifugados a 4.000 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi, então, descartado. A seguir, foi adicionado 1 mL de glicerol 10% gelado estéril a um dos tubos, o qual teve o seu precipitado suspenso. Depois, essa mistura foi transferida para o tubo restante, o qual também teve o seu precipitado suspenso. A mistura resultante foi, então, dividida em alíquotas de 100 µL para estocagem a -80°C.

Já para a análise da eficiência de transformação, uma das alíquotas de 100 µL da bactéria eletrocompetente foi colocada em repouso num recipiente com gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL do plasmídeo pECK (10 ng/µL) ao tubo contendo as células bacterianas, o qual, por sua vez, foi colocado em repouso por mais 10 minutos. A mistura foi, então, transferida para uma cubeta de eletroporação (2 mm) (BioAgency) previamente resfriada. Depois, com o auxílio de um eletroporador GenePulser XCell[™]TM Eletroporation System (Bio-RAD), a mistura foi submetida a um pulso elétrico de 250 V com capacitância de 25 µF e com resistência de 200 Ω. Após o pulso, foi adicionada uma

alíquota de caldo BHI a 37°C suficiente para completar o volume do tubo com as células eletroporadas para 1 mL. Estas, então, foram deixadas num banho-maria a 37°C por um período de 2 a 3 horas. Passado esse tempo, essa cultura foi diluída em múltiplos de 10, sendo as diluições plaqueadas, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em meio BHI sólido acrescido do antibiótico canamicina (25 µg/mL). As placas, por sua vez, foram incubadas a 37°C por 48 horas.

3.4.9. Transformação de *C. pseudotuberculosis* 1002

Após a confecção de *C. pseudotuberculosis* 1002 eletrocompetente, foi necessário transformar as células eletrocompetentes previamente confeccionadas com o produto da extração de DNA plasmidiano para que fosse possível gerar a linhagem mutante $\Delta sigH$ através de eventos de recombinação homóloga simples (Figura 3.2) entre o plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™]) contendo o fragmento interno do gene *sigH* e o gene *sigH* presente no cromossomo da bactéria, como descrito por Miyoshi e colaboradores (2002).

Para tanto, esse procedimento foi realizado seguindo-se alguns dos mesmos passos descritos na seção 3.4.8 (avaliação da eficiência das células competentes). Porém, pode-se dizer, resumidamente, que uma alíquota de 10 µL do produto da extração de DNA plasmidiano em pequena escala (100 ng/µL) foi misturado com os 100 µL presentes numa das alíquotas de células eletrocompetentes, sendo a mistura colocada em repouso num recipiente com gelo por 10 minutos. Para o controle negativo, foram adicionados 10 µL de água milli-Q estéril ao invés dos plasmídeos construídos ao tubo contendo a bactéria. Após o pulso, também realizado com o auxílio do eletroporador GenePulser XCell[™] Electroporation System (Bio-RAD), foi adicionada uma alíquota de caldo BHI a 37°C suficiente para completar o volume do tubo com as células eletroporadas para 1 mL. Estas, então, foram deixadas num banho-maria a 37°C por um período de 3 a 4 horas.

O processo de seleção dos transformantes consistiu no plaqueamento, com o auxílio de uma alça de Drigalski, de alíquotas de 200 µL da cultura em meio BHI sólido acrescido do antibiótico canamicina (25 µg/mL). As placas foram, então, incubadas a 37°C por 48 horas, sendo que, após esse período, elas foram avaliadas quanto à presença ou à ausência de colônias de *C. pseudotuberculosis* resistentes ao antibiótico em questão.

A etapa seguinte consistiu na seleção dos clones contidos nessas placas para que fosse possível proceder com a confirmação do evento de recombinação na linhagem

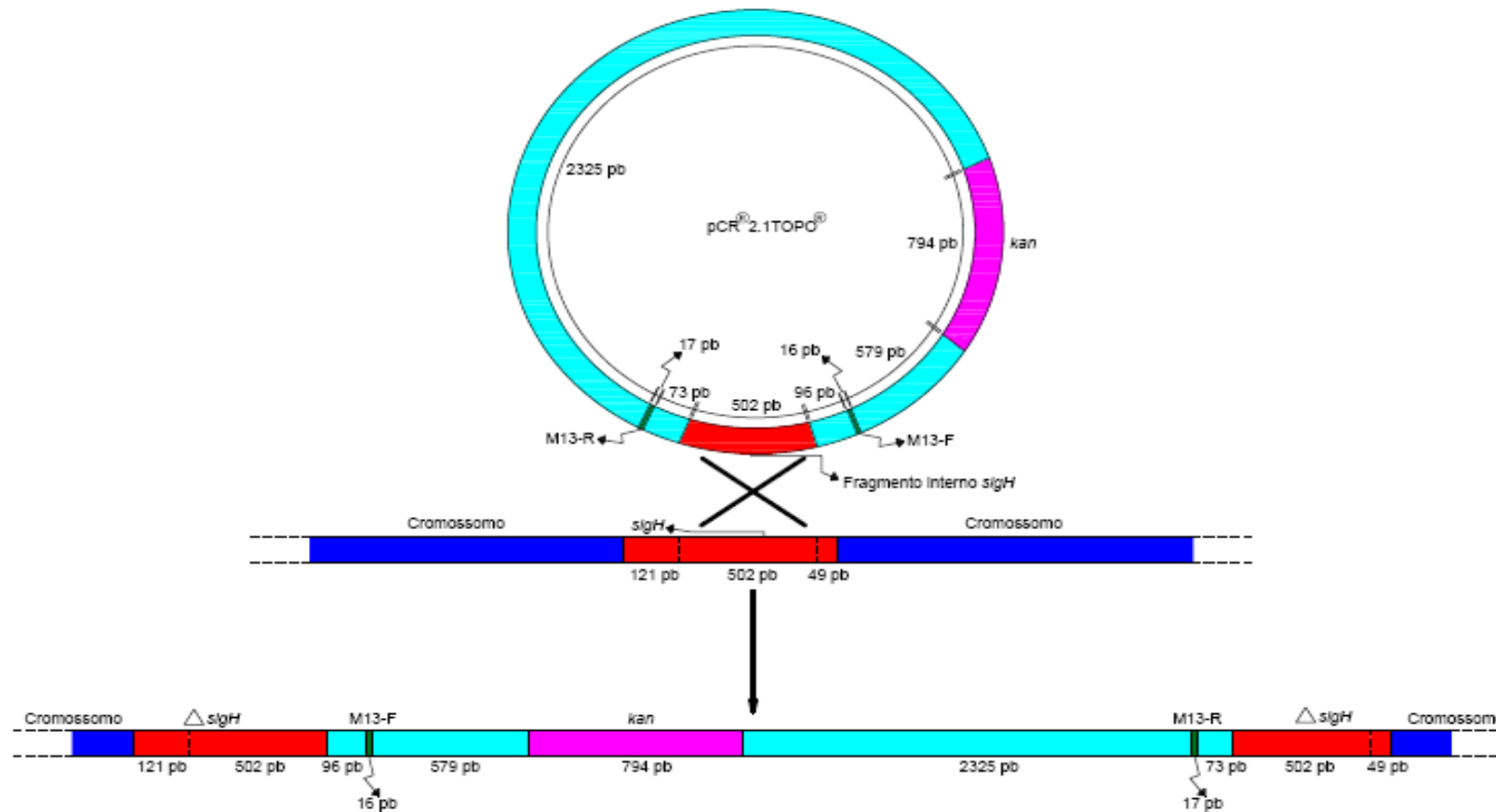


Figura 3.2: Representação esquemática do evento de recombinação homóloga simples entre o plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™) contendo o fragmento interno do gene *sigH* e o gene propriamente dito presente no cromossomo bacteriano para a geração da linhagem mutante $\Delta sigH$ deficiente para o fator sigma alternativo σ^H .

3.5. Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*

3.5.1. Extração de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* $\Delta sigH$

Primeiramente, antes de se proceder com a confirmação do evento de recombinação da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* propriamente dita, foi necessária a realização da extração do DNA genômico da linhagem mutante deficiente para o fator sigma alternativo σ^H , sendo que esse procedimento foi feito da mesma maneira como descrito na seção 3.4.1.

3.5.2. Confirmação por PCR

Com o intuito de confirmar o evento de recombinação no mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*, foram feitas várias reações de PCR cujos iniciadores são mostrados na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Iniciadores utilizados para a confirmação da mutação na linhagem 1002 ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis*.

Alvo	Iniciadores 5'-3'
$sigH_e$	$sigH_e$ -F: ATGGCAACGAAAACAACCTGA $sigH_e$ -R: TTATGCCTTCGCCTTTCCAA
$sigH_i$	$sigH_i$ -F: TGCAAGAGACCTACATCAAGG $sigH_i$ -R: GTTTCAGAACTGTGAGAAGCC
<i>Kan</i>	<i>Kan</i> -F: ATGATTGAACAAGATGGATTG <i>Kan</i> -R: TTAATAATTCAGAAGAAGCTC
pCR [®] 2.1-TOPO [®] -M13	M13-F: GTAAAACGACGGCCAG M13-R: CAGGAAACAGCTATGAC

Tais ensaios exigiram combinações variadas dos diferentes iniciadores, as quais estão representadas na tabela 3.3 e na figura 3.3.

Tabela 3.3: Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para a confirmação da mutação na linhagem 1002 ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados.

Iniciadores 5'-3'	Tamanho esperado dos fragmentos amplificados
Kan-F – Kan-R	794 pb
Kan-F – sigH _i -R	3.711 pb
M13-F – sigH _i -F	614 pb
M13-R – sigH _i -R	592 pb
sigH _e -F – sigH _e -R	5.074 pb
M13-F – sigH _e -F	735 pb
M13-R – sigH _e -R	641 pb

O primeiro ensaio de PCR feito, o qual tinha um volume final de 25 μ L, continha 0,5 μ L do DNA genômico extraído da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* (100 ng/ μ L); 5,0 μ L do tampão 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 2,0 μ L de MgCl₂ (25mM) (Promega); 1,0 μ L de dNTP (10mM) (Promega); 0,5 μ L do iniciador Kan-F (100 pMoles/ μ L); 0,5 μ L do iniciador Kan-R (100 pMoles/ μ L); 0,125 μ L da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 15,37 μ L de água milli-Q estéril. Essa amplificação, a qual foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Já a segunda reação de PCR, a qual também tinha um volume final de 25 μ L, continha 0,5 μ L do DNA genômico extraído da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* (100 ng/ μ L); 2,5 μ L do tampão LongRange PCR Buffer 10X (Qiagen); 2,0 μ L de MgCl₂ (25mM) (Qiagen); 1,0 μ L de dNTP (10mM) (Qiagen); 0,5 μ L do iniciador Kan-F (100 pMoles/ μ L); 0,5 μ L do iniciador sigH_i-R (100 pMoles/ μ L); 0,2 μ L da enzima Taq DNA polimerase do LongRange PCR Enzyme Mix (1 U/ μ L) (Qiagen) e 17,8 μ L de água milli-Q estéril. Essa amplificação, a qual foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 68°C por 5 minutos; e extensão final a 68°C por 7 minutos.

A terceira rodada de amplificações, as quais tinham um volume final de 25 µL, continham 0,5 µL do DNA genômico extraído da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* (100 ng/µL); 5,0 µL do tampão 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 2,0 µL de $MgCl_2$ (25mM) (Promega); 1,0 µL de dNTP (10mM) (Promega); 0,5 µL do iniciador M13-F (100 pMoles/µL) e 0,5 µL do iniciador sigH_i-F (100 pMoles/µL) ou 0,5 µL do iniciador M13-R (100 pMoles/µL) e 0,5 µL do iniciador sigH_i-R (100 pMoles/µL); 0,125 µL da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 15,37 µL de água milli-Q estéril. Essa amplificação, a qual foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Por sua vez, o quarto ensaio de PCR, a qual tinha um volume final de 25 µL, continha 0,5 µL do DNA genômico extraído da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* (100 ng/µL); 2,5 µL do tampão LongRange PCR Buffer 10X (Qiagen); 2,0 µL de $MgCl_2$ (25mM) (Qiagen); 1,0 µL de dNTP (10mM) (Qiagen); 0,5 µL do iniciador sigH_e-F (100 pMoles/µL); 0,5 µL do iniciador sigH_e-R (100 pMoles/µL); 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase do LongRange PCR Enzyme Mix (1 U/µL) (Qiagen) e 17,8 µL de água milli-Q estéril. Essa amplificação, a qual foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 68°C por 7 minutos; e extensão final a 68°C por 7 minutos.

As últimas rodadas de amplificação, as quais tinham um volume final de 25 µL, continham 0,5 mL do DNA genômico extraído da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* (100 ng/µL); 5,0 µL do tampão 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 2,0 µL de $MgCl_2$ (25mM) (Promega); 1,0 µL de dNTP (10mM) (Promega); 0,5 µL do iniciador M13-F (100 pMoles/µL) e 0,5 µL do iniciador sigH_e-F (100 pMoles/µL) ou 0,5 µL do iniciador M13-R (100 pMoles/µL) e 0,5 µL do iniciador sigH_e-R (100 pMoles/µL); 0,125 µL da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 15,37 µL de água milli-Q estéril. Essa amplificação, a qual foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Além disso, uma alíquota de 2 μ L dos produtos dessas amplificações foi submetida à resolução eletroforética (vide seção 3.3) para que a sua qualidade e o tamanho do fragmento amplificado pudessem ser estimados.

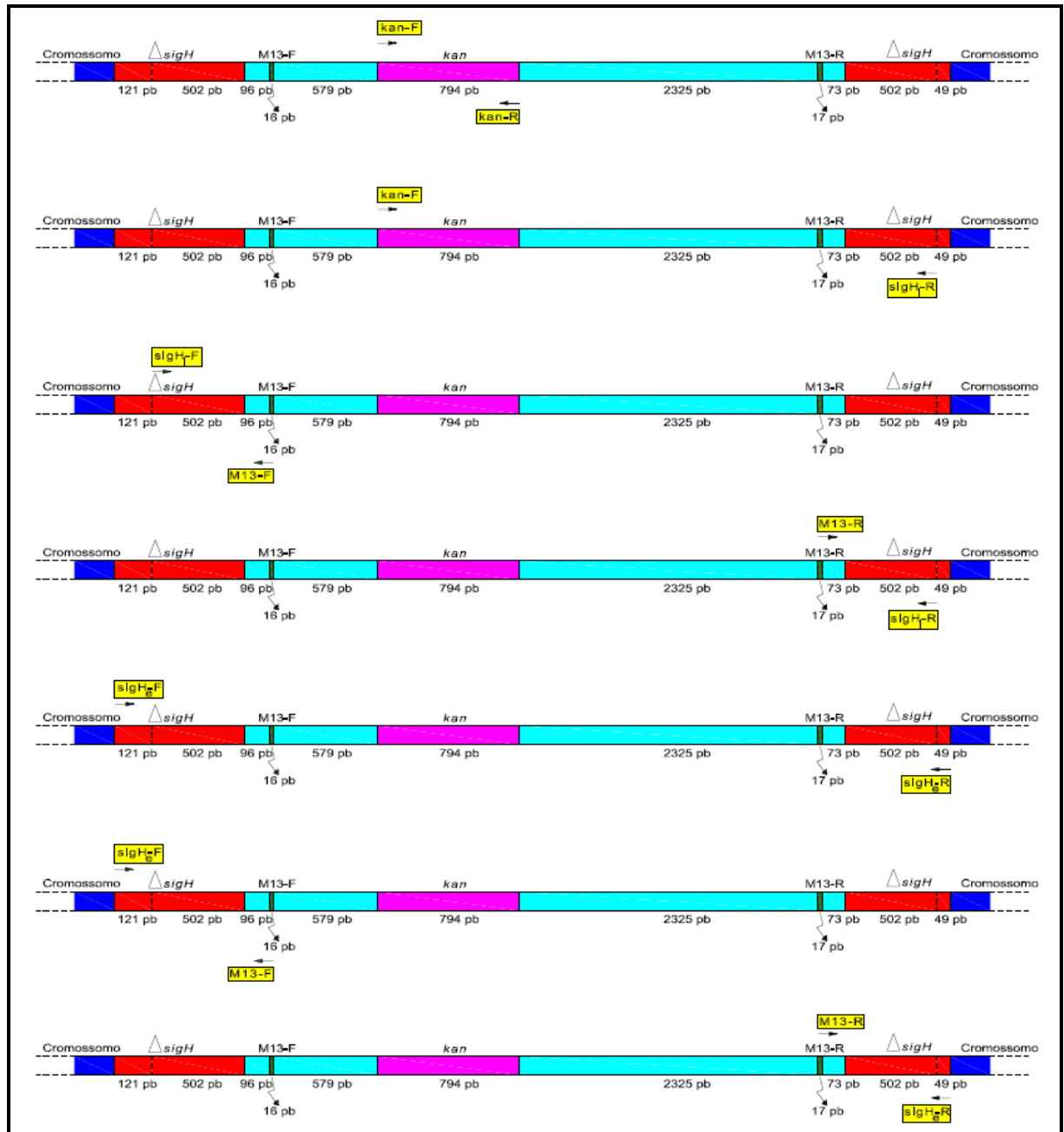


Figura 3.3: Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para a confirmação da mutação na linhagem 1002 ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis*.

3.6. Caracterização morfológica, bioquímica e molecular da linhagem mutante

ΔsigH* de *C. pseudotuberculosis

3.6.1. Coloração de Gram

Com a finalidade de confirmar que os clones recombinantes previamente selecionados pertenciam à espécie *C. pseudotuberculosis*, foi feita a coloração de Gram tanto para a linhagem tipo-selvagem 1002 quanto para a linhagem mutante *ΔsigH* obtida do seguinte modo: uma pequena porção de uma colônia de cada uma das duas linhagens utilizadas neste estudo foi adicionada a uma gota de solução salina 0,9% que encontrava-se sobre uma lâmina de microscópio. Essa mistura foi, então, homogeneizada e espalhada com o auxílio de uma alça de plástico para que o esfregaço resultante pudesse ser passado, rapidamente, pela chama de um bico de Bunsen. Depois do seu resfriamento, foi adicionada uma alíquota de cristal violeta ao esfregaço e, após um minuto, esse corante foi lavado com água destilada. Foi, então, adicionada uma alíquota de lugol ao esfregaço, o qual também foi lavado com água destilada ao se passar um minuto. O passo seguinte foi a adição de uma alíquota de álcool-acetona a esse esfregaço e a sua lavagem quase imediata também com água destilada. Depois, foi adicionada uma alíquota de do corante fucsina, o qual permaneceu em contato com o esfregaço por apenas 30 segundos, sendo lavado com água destilada em logo seguida. Por último, a lâmina foi colocada numa estufa a 37°C para que ela pudesse secar antes de ser observada no microscópio.

3.6.2. Testes bioquímicos

Com o mesmo propósito da coloração de Gram, foi feita uma série de testes bioquímicos específicos para o reconhecimento da espécie bacteriana *C. pseudotuberculosis*, como os testes para a verificação da fermentação de carboidratos e os testes para a verificação de atividade enzimática (Tabela 3.4) (Collet *et al.*, 1994; Smibert & Krieg, 1994).

Resumidamente, foram semeadas, pelo método de esgotamento, em meio BHI sólido, as bactérias *E. coli*, *Rhodococcus equi*, *Proteus sp.*, *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e *C. pseudotuberculosis* mutante *ΔsigH*, sendo as placas incubadas a 37°C por 48 horas. Passado esse tempo, colônias desses microrganismos foram dissolvidas em 5 mL de solução salina 0,9% até que esta ficasse bastante turva. Depois, 400 µL de cada uma dessas misturas foram inoculados em cada um dos tubos contendo os diferentes meios de cultura referentes a cada uma das provas bioquímicas (meio glicose 1%, meio manose 1%, meio manitol 1%, meio sacarose 1%, meio

maltose 1%, meio ribose 1%, meio uréia, meio nitrato e meio SIM), sendo estes incubados a 37°C por 48 horas. Após esse período, os tubos foram avaliados quanto à presença ou à ausência da característica esperada.

Além disso, também foi realizada a prova da catalase para se avaliar a capacidade ou não da bactéria de hidrolisar peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esse teste foi feito do seguinte modo: uma porção de uma colônia de cada uma das cepas bacterianas em questão foi colocada numa lâmina de microscópio e a elas foi adicionada uma gota de H₂O₂ 3%. Neste momento, as bactérias foram avaliadas quanto à formação ou não de bolhas.

Tabela 3.4: Características bioquímicas de *C. pseudotuberculosis*. **ADAPTADO:** Dorella *et al.*, 2006a.

Teste	Resultados esperados
Fermentação de glicose	+
Fermentação de maltose	+
Fermentação de manose	+
Fermentação de manitol	-
Fermentação de sacarose	D
Fermentação de ribose	-
Hidrólise de peróxido de hidrogênio	+
Degradação de uréia	+
Redução de nitrato a nitrito	D
Produção de gás sulfídrico	-

+: mais de 90% são positivos; d: 21-89% são positivos; -: mais de 90% são negativos.

3.6.3. PCR-multiplex

Assim como a coloração de Gram e os testes bioquímicos, foi feita uma PCR-multiplex (mPCR) (Pacheco *et al.*, 2007), que também é espécie específica, na qual são utilizados iniciadores para a amplificação dos genes 16S rDNA, *rpoB* e *pld* (Tabela 3.5), para ratificar a espécie dos clones recombinantes da linhagem mutante *ΔsigH* como sendo *C. pseudotuberculosis*.

Especificamente, a mPCR feita, a qual tinha um volume final de 10 µL, continha 1,0 µL do DNA genômico extraído ou da linhagem tipo-selvagem 1002 ou da linhagem mutante *ΔsigH* de *C. pseudotuberculosis* (100 ng/µL); 2,0 µL do tampão 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 1,2 µL de MgCl₂ (25mM) (Promega); 0,8 µL de dNTP (10mM) (Promega);

0,2 µL do iniciador MPLD1 (100 pMoles/µL); 0,2 µL do iniciador MPLD2 (100 pMoles/µL); 0,2 µL do iniciador 16S-F (100 pMoles/µL); 0,2 µL do iniciador 16S-R (100 pMoles/µL); 0,2 µL do iniciador C2700-F (100 pMoles/µL); 0,2 µL do iniciador C3130-R (100 pMoles/µL); 0,2 µL da enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 3,8 µL de água milli-Q estéril. Essa amplificação, a qual foi realizada com o auxílio do termociclador ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 3.5: Iniciadores utilizados na reação de mPCR para a identificação de *C. pseudotuberculosis*.

Alvo	Iniciador 5'-3'
16S rDNA	16S-F: ACCGCACTTTAGTGTGTGTG
	16S-R: TCTCTACGCCGATCTTGTAT
<i>rpoB</i>	C2700-F: CGTATGAACATCGGCCAGGT
	C3130-R: TCCATTTGCGCGAAGCGCTG
PLD	MPLD1: ATAAGCGTAAGCAGGGAGCA
	MPLD2.1: ATCAGCGGTGATTGTCTTCCAGG

3.7. Resistência das linhagens tipo-selvagem e mutante ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* a condições de estresse *in vitro*

3.7.1. Condições de estresse

Para a avaliação da resistência da linhagem tipo-selvagem 1002 e da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*, foram feitos testes utilizando-se diferentes condições de estresse *in vitro*, as quais estão descritas na tabela 3.6.

Tabela 3.6: Condições de estresse *in vitro*.

Condições de estresse	Método	Agente gerador de estresse	Concentrações testadas	Resistência (1002 wt) no início da fase log	Referência
Estresse Osmótico	Suspensão da cultura em meio estéril com NaCl	NaCl	2,0M	<50%	Pacheco, 2010.
Estresse Oxidativo	Adição de solução comercial de H ₂ O ₂ (30% em H ₂ O – Sigma-Aldrich®) ao meio de cultura	H ₂ O ₂	70mM	<50%	
Estresse Ácido	Suspensão da cultura em meio estéril acidificado com solução concentrada de HCl	HCl	pH 5,0	<50%	
Estresse Térmico	Incubação das culturas a uma determinada temperatura	Temperatura	50 °C	50 – 90%	

3.7.2. Avaliação da resistência relativa

Para que os experimentos de resistência das linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* às quatro condições de estresse *in vitro* supracitadas pudessem ser realizados, foi necessário, como primeiro passo, fazer uma curva de crescimento para cada uma delas. Tais curvas foram feitas por meio da medição, em

duplicata, da densidade ótica (DO_{600}) de hora em hora a fim de se saber o perfil de crescimento de ambas as linhagens em caldo BHI.

Já a execução dos experimentos de resistência propriamente ditos se deu do seguinte modo (Figura 3.4 e 3.5): uma alíquota de 800 μ L de um pré-inóculo das linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante ($\Delta sigH$) feito 20-24 horas antes foi adicionada a um recipiente com 80 mL de caldo BHI com Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich[®]) (0,05%) acrescido ou não de canamicina (25 μ g/mL). Ao atingir o início da fase log de crescimento bacteriano ($DO_{600} \approx 0,2$), três alíquotas de 20 mL da cultura foram distribuídas em três tubos, os quais foram centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de um dos três tubos foi suspenso em 20 mL de caldo BHI com Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich[®]) (0,05%) acrescido ou não de canamicina (25 μ g/mL), o qual seria o controle. Os precipitados dos dois tubos restantes foram suspensos em 20 mL de caldo BHI com Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich[®]) (0,05%), acrescido ou não de canamicina (25 μ g/mL), mais o agente causador do estresse *in vitro* em questão. Todos os tubos, com a exceção daqueles que foram submetidos ao estresse térmico (50°C), foram incubados a 37°C e a 140 rpm por 4,5 horas (Figura 3.4). As leituras de densidade ótica, feitas em triplicata, e os plaqueamentos das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , feitos em duplicata, foram realizados nos tempos 15, 60, 180 e 270 minutos. As placas foram incubadas a 37°C por 48-72 horas para que o monitoramento da viabilidade bacteriana pudesse ser feito por meio da contagem de UFC/mL (Figura 3.5).

As curvas de crescimento e de viabilidade resultantes dos experimentos de resistência das linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* às condições de estresse *in vitro* e as curvas de crescimento relativo e de viabilidade relativa foram plotadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism v.5.0. (GraphPad Software, Inc.). Além disso, as diferenças no crescimento e na viabilidade das culturas tratadas em comparação com as culturas não tratadas (controles) foram validadas por estatística não paramétrica (Teste T de Student).

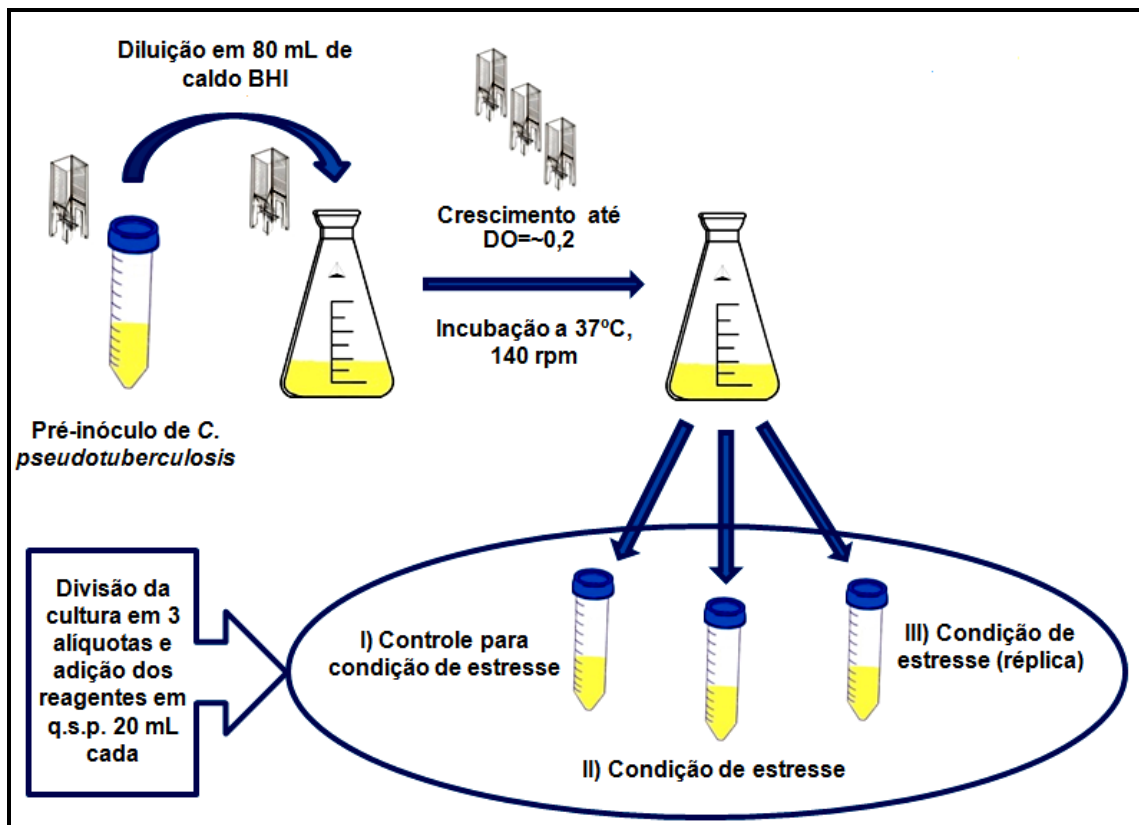


Figura 3.4: Representação esquemática da etapa inicial do experimento realizado com o propósito de se avaliar a resistência das linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* a agentes causadores de estresse. Após a diluição do pré-inóculo, a densidade ótica (DO₆₀₀) da cultura foi regularmente monitorada, em espectrofotômetro, até atingir o valor de aproximadamente 0,2. Neste momento, houve a separação da cultura em tubos de 50 mL, sendo que à primeira alíquota nada foi adicionado e às segunda e terceira alíquotas foi adicionado o agente causador do estresse em questão a uma concentração pré-estabelecida. **ADAPTADO:** Castro, 2009.

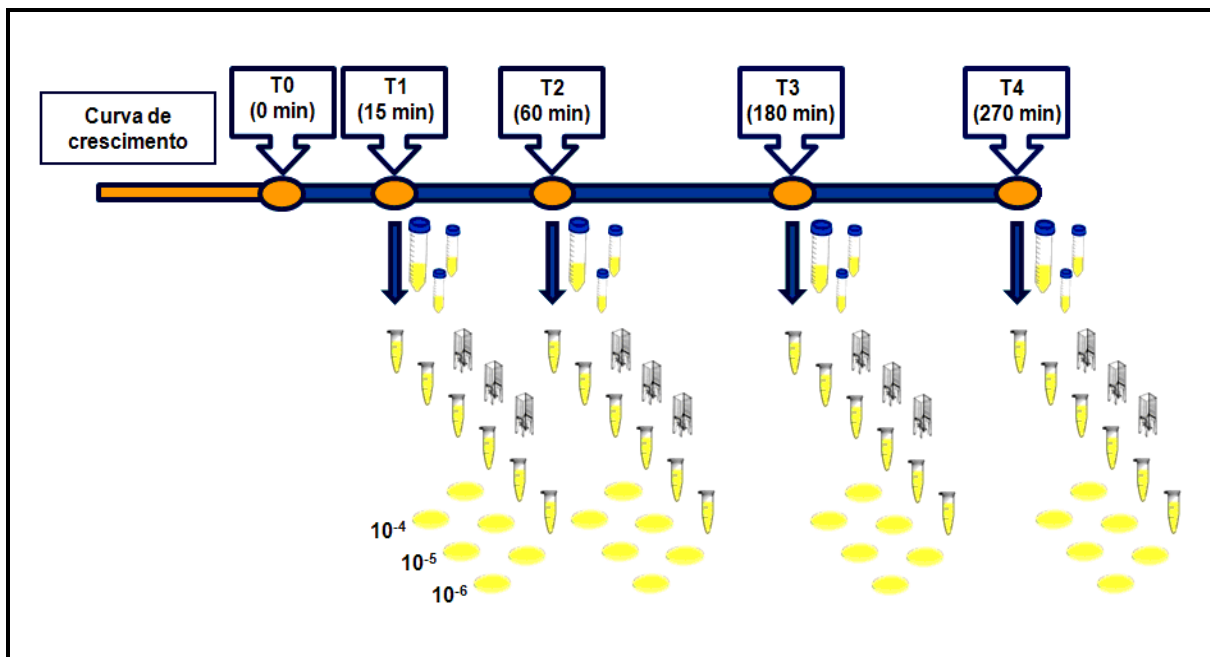


Figura 3.5: Esquema ilustrativo dos procedimentos adotados para o monitoramento das curvas de crescimento em intervalos de tempo específicos. Para todos os tempos definidos (15, 60, 180 e 270 min) foram realizadas leituras de DO_{600nm} em triplicata e diluições seriadas em múltiplos de 10, sendo as três maiores destas (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) plaqueadas duas vezes. Os procedimentos representados foram realizados para cada um dos três tubos de 50 mL contendo cultura. Estes tubos foram mantidos a $37^{\circ}C$ (exceto pelas alíquotas submetidas ao estresse térmico) e sob agitação a 140 rpm durante a realização das curvas, sendo descontados os tempos gastos durante a manipulação em fluxo laminar. **ADAPTADO:** Castro, 2009.

3.8. Análises bioinformáticas e estatísticas

As análises estatísticas, neste estudo, foram realizadas por meio do uso dos programas GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Já as análises bioinformáticas foram feitas pela utilização de uma série de programas padrão, como o BLAST, o qual se encontra disponível na página do NCBI.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Geração da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*

A amplificação, por meio do uso de iniciadores específicos (Tabela 3.1), de uma região interna do gene *sigH* a partir do DNA genômico extraído da linhagem tipo-selvagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* gerou um fragmento de aproximadamente 502 pb (Figura 4.1), o que, por sua vez, possibilitou a construção de plasmídeos, através da clonagem do fragmento obtido no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™]), os quais foram transformados em *E. coli* Top10. As bactérias transformadas foram, então, cultivadas em meio LB sólido acrescido do antibiótico canamicina (50 µg/mL) e, desse modo, foi possível selecionar três clones.

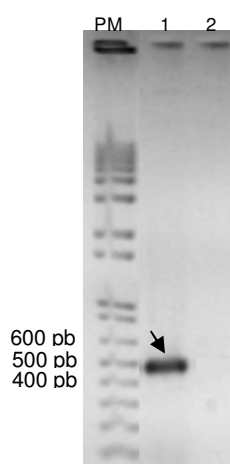


Figura 4.1: Produto da amplificação da região interna do gene *sigH*. Negativo de fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[™]); canaleta 1: produto da amplificação; canaleta 2: controle negativo; seta: fragmento abaixo do tamanho esperado devido a baixa resolução do gel na região.

Com o propósito de se confirmar o evento de clonagem, os plasmídeos pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™]) contendo a região amplificada do gene do fator sigma alternativo σ^H , extraídos dos clones previamente selecionados, foram submetidos a uma reação de PCR, resultando na amplificação de um inserto com cerca de 502 pb (Figura 4.2). Além disso, tal vetor foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen[™]), o que resultou na liberação do fragmento interno do gene *sigH* (502 pb) mais uma pequena porção do plasmídeo (18 pb), apresentando, assim, um tamanho aproximado de 520 pb (Figura 4.3). Ademais, o inserto foi seqüenciado, apresentando uma identidade de 99% com a seqüência codificadora do gene *sigH* de *C. pseudotuberculosis* 1002, o que confirma, assim, a ligação

da região interna amplificada do gene codificador do fator sigma alternativo em questão no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™]) (Figura 4.4).

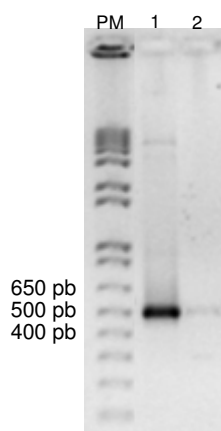


Figura 4.2: Confirmação da presença do fragmento interno do gene codificador do fator sigma alternativo σ^H no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] através de PCR. Negativo de fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[™]); canaleta 1: produto da amplificação; canaleta 2: controle negativo.

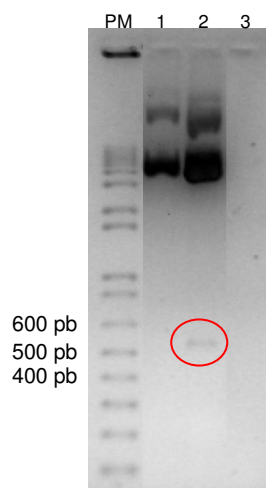


Figura 4.3: Confirmação da presença do fragmento interno do gene codificador do fator sigma alternativo σ^H no vetor pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™]) através da digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen[™]). Negativo de fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[™]); canaleta 1: plasmídeo contendo o fragmento do gene *sigH* não digerido; canaleta 2: plasmídeo contendo o fragmento do gene *sigH* digerido; canaleta 3: controle negativo.

```

>[gb|CP001809.1|] D Corynebacterium pseudotuberculosis 1002, complete genome
Length=2335112

Features in this part of subject sequence:
  RNA polymerase sigma factor RpoE

Score = 918 bits (497), Expect = 0.0
Identities = 502/504 (99%), Gaps = 2/504 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query  94      GTTTCAGAACTGTGAGAAGCCGCGAGGCTTCATTCTCAGACGACGCGTTTCGCTCACG  153
      |||
Sbjct  549057  GTTTCAGAACTGTGAGAAGCCGCGAGGCTTCATTCTCAGACGACGCGTTTCGCTCACG  548998

Query  154     CCAATTCGGTGGTTCATGTGCCACGTCTTCAACGCTTCTCTGAGTTGTTTCTTCCCGG  213
      |||
Sbjct  548997  CCAATTCGGTGGTTCATGTGCCACGTCTTCAACGCTTCTCTGAGTTGTTTCTTCCCGG  548938

Query  214     TGTAAATCGGCTCATCACTGTGCCAGGGGAGTCTCCATAATGTCGGCGATCTCTTATAC  273
      |||
Sbjct  548937  TGTAAATCGGCTCATCACTGTGCCAGGGGAGTCTCCATAATGTCGGCGATCTCTTATAC  548878

Query  274     GCGAGGCCCTTCCACATCCGCGTAATAGACCACCATCCGATAGTCTCACTTAATTCATTC  333
      |||
Sbjct  548877  GCGAGGCCCTTCCACATCCGCGTAATAGACCACCATCCGATAGTCTCACTTAATTCATTC  548818

Query  334     ATTGCTTGAGCAATGCGCTGGTTGGGAAGGTTTTTCAGTGCCTCCACCTCAGCGGATTCC  393
      |||
Sbjct  548817  ATTGCTTGAGCAATGCGCTGGTTGGGAAGGTTTTTCAGTGCCTCCACCTCAGCGGATTCC  548758

Query  394     AATCCCGTGGAGTCATGCGAAGCAGTAGCTAAGAGTTGATAATCAGTCACGTCTTCCGCA  453
      |||
Sbjct  548757  AATCCCGTGGAGTCATGCGAAGCAGTAGCTAAGAGTTGATAATCAGTCACGTCTTCCGCA  548698

Query  454     GAAGATTGCACCGGCTGACGTTTCTTTTACGGTAGGAATTGATATAAGTGTTCATG  513
      |||
Sbjct  548697  GAAGATTGCACCGGCTGACGTTTCTTTTACGGTAGGAATTGATATAAGTGTTCATG  548638

Query  514     ATTCGGTAGAGCCATGCCTTGAGTTAGGTTCCCTCTTTAAAGAAAGCAACGCCTGAAC  573
      |||
Sbjct  548637  ATTCGGTAGAGCCATGCCTTGAGTT-GGTTCCTCTTTAAAGAAAGCAACGCCTGAA-  548580

Query  574     AGGCCTTGATGTAGGTCTCTTGCA  597
      |||
Sbjct  548579  AGGCCTTGATGTAGGTCTCTTGCA  548556

```

```

>[gb|CP001809.1|] D Corynebacterium pseudotuberculosis 1002, complete genome
Length=2335112

Features in this part of subject sequence:
  RNA polymerase sigma factor RpoE

Score = 922 bits (499), Expect = 0.0
Identities = 502/503 (99%), Gaps = 1/503 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  65      TGCAAGAGACCTACATCAAGGCCCTTTCAGGCGCTTGTCTCTTTAAAGAGGGAACCAAC  124
      |||
Sbjct  548556  TGCAAGAGACCTACATCAAGGCCCTTTCAGGCGCTTGTCTCTTTAAAGAGGGAACCAAC  548614

Query  125     CTCAAGGCATGGCTCTACCGAATCATGACAAACACTTATATCAATTCCTACCGTAAAAAG  184
      |||
Sbjct  548615  CTCAAGGCATGGCTCTACCGAATCATGACAAACACTTATATCAATTCCTACCGTAAAAAG  548674

Query  185     AAACGTCAGCCGGTGCAATCTTCTCGGGAAGACGTGACTGATTATCAACTCTTAGCTACT  244
      |||
Sbjct  548675  AAACGTCAGCCGGTGCAATCTTCTCGGGAAGACGTGACTGATTATCAACTCTTAGCTACT  548734

Query  245     GCTTCGCATGACTCCACGGGATTGGAATCCGCTGAGGTGGAGGCACTGAAAAACCTTCCC  304
      |||
Sbjct  548735  GCTTCGCATGACTCCACGGGATTGGAATCCGCTGAGGTGGAGGCACTGAAAAACCTTCCC  548794

Query  305     AACCAGCGCATTGCTCAAGCAATGAATGAATTAAGTGAGGACTATCGGATGGTGGTCTAT  364
      |||
Sbjct  548795  AACCAGCGCATTGCTCAAGCAATGAATGAATTAAGTGAGGACTATCGGATGGTGGTCTAT  548854

Query  365     TACGCGGATGTGGAAGGCCCTCGCGTATAAAGAGATCGCCGACATTATGGAGACTCCCCTG  424
      |||
Sbjct  548855  TACGCGGATGTGGAAGGCCCTCGCGTATAAAGAGATCGCCGACATTATGGAGACTCCCCTG  548914

Query  425     GGCACAGTGATGAGCCGATTACACGGGGAAGAAAACTCAGAGAAGCGTTGAAAGAC  484
      |||
Sbjct  548915  GGCACAGTGATGAGCCGATTACACGGGGAAGAAAACTCAGAGAAGCGTTGAAAGAC  548974

Query  485     GTGGCACATGACCACGGAATTGGCGTGAGCGAAACCGCGTCGTGAGAAATGAAGCCTCG  544
      |||
Sbjct  548975  GTGGCACATGACCACGGAATTGGCGTGAGCGAAACCGCGTCGTGAGAAATGAAGCCTCG  549034

Query  545     GCGGCTTCTCACAGTTCTGAAAC  567
      |||
Sbjct  549035  GCGGCTTCTCACAGTTCTGAAAC  549057

```

Figura 4.4: Resultado de similaridade obtido para a sequência do fragmento interno do gene do fator sigma alternativo σ^H de *C. pseudotuberculosis* 1002 inserido no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®], utilizando a ferramenta Blastn.

Depois de confirmada a presença do fragmento interno amplificado do gene *sigH* nos plasmídeos extraídos dos clones de *E. coli* Top10 selecionados, essas construções foram transformadas em *C. pseudotuberculosis* 1002 com o intuito de se gerar uma linhagem mutante para o fator sigma alternativo σ^H . As bactérias transformadas foram, então, cultivadas em meio BHI sólido acrescido do antibiótico canamicina (25 $\mu\text{g/mL}$) e, assim, após algumas tentativas, foi possível selecionar de um a três clones.

4.2. Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante ΔsigH de *C. pseudotuberculosis*

Além de confirmar que os clones recombinantes obtidos não se tratavam de algum microrganismo contaminante, mas sim pertenciam à espécie *C. pseudotuberculosis*, foi necessária a confirmação do evento de recombinação no mutante ΔsigH . Para isso, foram feitas várias reações de PCR cujas diferentes combinações de iniciadores se encontram representadas na tabela 3.5.

O primeiro ensaio de PCR feito, no qual foram combinados os iniciadores Kan-F e Kan-R, resultou, como esperado, na amplificação de fragmentos de 794 pb para a linhagem mutante (Figura 4.5). Essa combinação foi sugerida uma vez que a linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* não apresenta nenhuma cópia do gene *Kan*, que confere resistência ao antibiótico canamicina, no seu genoma, mas o vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™]), o qual é um plasmídeo que não é replicativo nessa espécie bacteriana. Portanto, a amplificação desse gene, utilizando-se o DNA genômico extraído dos clones previamente selecionados como molde, seria uma evidência de que o evento de recombinação havia ocorrido e de que o plasmídeo contendo o fragmento interno do gene codificador do fator sigma alternativo σ^H havia sido incorporado ao cromossomo da bactéria, interrompendo o seu respectivo gene e, assim, gerando a linhagem ΔsigH .

Já a segunda rodada de reações de PCR, em que foi utilizado um iniciador para o gene *Kan* (Kan-F) juntamente com um iniciador para a região interna do gene do fator sigma alternativo em questão (sigH_i-R) produziu um fragmento de 3.711 pb para o mutante ΔsigH (Figura 4.5). O tamanho desse amplicon se dá pela soma do número de pares de bases que constituem uma porção do plasmídeo (2.398 pb), a ORF de resistência à canamicina (794 pb), o sítio de anelamento do iniciador M13-R (17 pb) e o fragmento interno do gene do fator sigma (502 pb) (vide figura 3.3 para melhor visualização). Esse resultado está em harmonia com aquele apresentado no parágrafo anterior, evidenciando que se deu o evento de

recombinação homóloga simples entre o vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[™]) com o fragmento interno do gene *sigH*, o qual também traz consigo o gene *Kan* e o sítios de anelamento dos iniciadores M13 que, em condições naturais, não estão presentes em *C. pseudotuberculosis*, e o cromossomo bacteriano.

A PCR na qual se combinou o iniciador M13-F com o iniciador complementar à região interna do gene do fator σ^H (sigH_i-F) amplificou um fragmento de 614 pb (Figura 4.5), do qual 96 pb são referentes à amplificação do plasmídeo, 16 pb à amplificação do sítio de anelamento do iniciador M13-F e 502 pb à amplificação do fragmento interno do gene *sigH* (vide figura 3.3 para melhor visualização). Por sua vez, o ensaio de PCR em que foram usados o iniciador M13-R juntamente com o iniciador para a região interna do gene do fator sigma estudado (sigH_i-R) amplificou um fragmento de 592 pb para o mutante $\Delta sigH$ (Figura 4.6). Destes, 73 pb são referentes à amplificação do plasmídeo, 17 pb à amplificação do sítio de anelamento do iniciador M13-R e 502 pb à amplificação do fragmento interno do gene *sigH* (vide figura 3.3 para melhor visualização). Tal resultado, assim como aqueles previamente apresentados, corrobora a ocorrência do evento de recombinação necessário para a geração da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*.

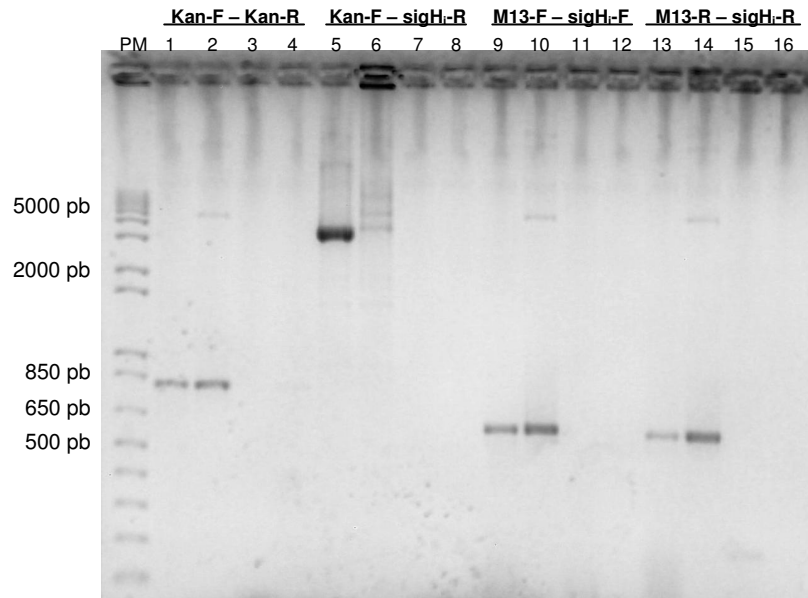


Figura 4.5: Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* para o gene do fator sigma alternativo σ^H através de ensaios de PCR. Negativo de fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); canaletas 1, 5, 9 e 13: linhagem mutante $\Delta sigH$; canaletas 2, 6, 10 e 14: plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™) contendo o fragmento interno do gene *sigH* (controle positivo); canaletas 3, 7, 11 e 15: linhagem tipo-selvagem 1002; canaletas 4, 8, 12 e 16: controle negativo. As várias combinações dos diferentes iniciadores relativas a cada amplificação estão discriminadas acima da numeração das canaletas na fotografia do gel.

A reação em que foram utilizados os iniciadores para as extremidades do gene *sigH* ($\text{sigH}_e\text{-F}$ e $\text{sigH}_e\text{-R}$), por sua vez, resultou em um fragmento de 5.074 pb (Figura 4.6). O tamanho de tal fragmento é devido à soma do número de pares de bases que constituem uma porção do plasmídeo (3.073 pb), a ORF de resistência à canamicina (794 pb), os sítios de anelamento dos iniciadores M13-F e M13-R (16 e 17 pb, respectivamente), o fragmento interno (502 pb) e o gene codificador do fator sigma estudado (672 pb) (vide figura 3.3 para melhor visualização), o que mostra, mais uma vez, que o gene *sigH* de *C. pseudotuberculosis* 1002 foi mutado.

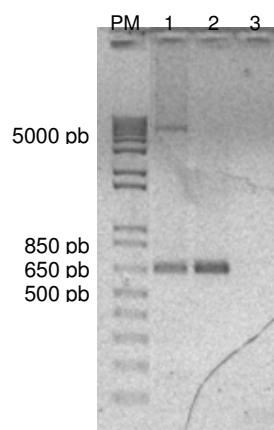


Figura 4.6: Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* para o gene do fator sigma alternativo σ^H através de um ensaio de PCR utilizando a combinação de iniciadores $\text{sigH}_e\text{-F-sigH}_e\text{-R}$.

Negativo de fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); canaleta 1: linhagem mutante ΔsigH ; canaleta 2: linhagem tipo-selvagem 1002; canaleta 3: controle negativo.

Por último, a combinação do iniciador M13-F com o iniciador para uma das extremidades do gene para o fator σ^H ($\text{sigH}_e\text{-F}$) possibilitou a amplificação de um fragmento de 735 pb (Figura 4.7). O tamanho desse amplicon é dado pela soma do número de pares de bases que constituem uma porção do plasmídeo (96 pb), o sítio de anelamento do iniciador M13-F (16 pb), o fragmento interno (502 pb) e o fragmento que antecede o sítio de anelamento do iniciador complementar à região interna do gene do fator σ^H ($\text{sigH}_i\text{-F}$) (121 pb) (vide figura 3.3 para melhor visualização). A combinação do iniciador M13-R com o iniciador para a outra extremidade do gene para o fator σ^H ($\text{sigH}_e\text{-R}$) resultou num fragmento de 641 pb (Figura 4.7), o qual se dá pela soma do número de pares de bases que constituem uma porção do plasmídeo (73 pb), o sítio de anelamento do iniciador M13-R (17 pb), o fragmento interno (502 pb) e o fragmento que antecede o o sítio de anelamento do iniciador complementar à região interna do gene do fator σ^H ($\text{sigH}_i\text{-R}$) (49 pb) (vide figura 3.3 para melhor visualização). Assim, o resultado aqui apresentado, em conjunto com aqueles descritos previamente, confirma, em caráter definitivo, a ocorrência do evento de recombinação homóloga simples entre o vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™) contendo o fragmento interno do gene *sigH* e o cromossomo de *C. pseudotuberculosis*, o que levou à

interrupção desse gene e, por conseguinte, gerou a linhagem mutante $\Delta sigH$ deficiente para tal fator.

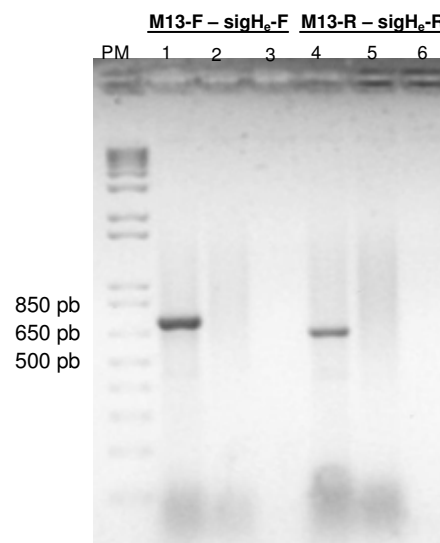


Figura 4.7: Confirmação do evento de recombinação na linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* para o gene do fator sigma alternativo σ^H através de um ensaio de PCR utilizando as combinações de iniciadores M13-F – SigH_e-F e M13-R – SigH_e-R. Negativo de fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); canaletas 1 e 4: linhagem mutante $\Delta sigH$; canaletas 2 e 5: linhagem tipo-selvagem 1002; canaletas 3 e 6: controle negativo. As combinações dos diferentes iniciadores relativas a cada amplificação estão discriminadas acima da numeração das canaletas na fotografia do gel.

Pode-se, então, dizer que o método utilizado para a geração da linhagem mutante $\Delta sigH$, o qual faz uso de um vetor incapaz de se replicar na espécie bacteriana de interesse, é bastante eficaz uma vez que há a necessidade do plasmídeo se recombinar com o cromossomo da bactéria para que ele seja replicado e, assim, ele não poderá ser encontrado neste organismo específico a não ser que tal evento tenha, de fato, ocorrido. Além disso, a maneira como a recombinação do vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen™) contendo o fragmento interno do gene do fator σ^H com o cromossomo de *C.*

pseudotuberculosis foi confirmada por meio de várias reações de PCR, nas quais foram utilizadas diferentes combinações de iniciadores, mostrou-se uma estratégia mais simples e rápida do que técnicas mais complexas tipicamente usadas, como o *Southern blot*. Desse modo, é possível afirmar que a utilização dessa metodologia para a geração de outras linhagens de *C. pseudotuberculosis* deficientes para algum gene cuja função se deseja estudar ou cuja virulência se deseja atenuar é bastante viável. Ademais, também há a possibilidade, por meio do uso de tais técnicas, de se produzir duplos-mutantes para o estudo da interação de dois dados genes ou para a obtenção de linhagens mais atenuadas, as quais se tornariam melhores candidatos vacinais para uma possível vacina contra a linfadenite caseosa.

4.3. Caracterização morfológica, bioquímica e molecular da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*

A coloração de Gram, a qual tinha como finalidade confirmar que os clones recombinantes selecionados não se tratavam de algum microrganismo contaminante, feita tanto para a linhagem tipo-selvagem 1002 quanto para a linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* obtida permitiu a visualização de bactérias coco-bacilares Gram-positivas.

Já os testes bioquímicos, cujo propósito era o mesmo da coloração de Gram, aos quais as linhagens tipo-selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis* foram submetidas mostraram que tais bactérias apresentavam as características bioquímicas típicas da espécie, como apresentado na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Resultado dos testes bioquímicos feitos para a identificação de *C. pseudotuberculosis*.

Teste	Resultados	
	wt	$\Delta sigH$
Fermentação de glicose	+	+
Fermentação de maltose	+	+
Fermentação de manose	+	+
Fermentação de manitol	-	-
Fermentação de sacarose	+	+
Fermentação de ribose	-	-
Hidrólise de peróxido de hidrogênio	+	+
Degradação de uréia	+	+
Redução de nitrato a nitrito	-	-
Produção de gás sulfídrico	-	-

wt: linhagem tipo-selvagem; $\Delta sigH$: linhagem mutante deficiente para o gene codificador do fator σ^H ; +: resultado positivo para a característica bioquímica em questão; -: resultado negativo para a característica bioquímica em questão.

Para ratificar que a espécie dos clones recombinantes da linhagem mutante era *C. pseudotuberculosis*, estes tiveram o seu DNA genômico extraído, o qual, por sua vez, foi utilizado como molde para uma reação de mPCR que tinha como genes alvo o 16S rDNA, o *rpoB* e o *pld*. Essa amplificação produziu, como esperado, fragmentos de 816, 446 e 203 pb, respectivamente (Figura 4.8).

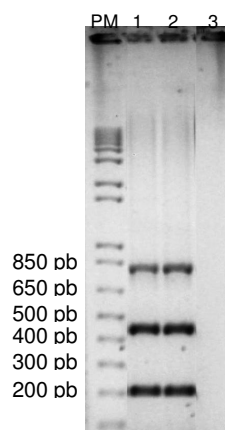


Figura 4.8: Produtos da reação de mPCR para a identificação de *C. pseudotuberculosis*. Negativo de fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. PM: padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); canaleta 1: produto da amplificação referente à linhagem mutante $\Delta sigH$; canaleta 2: produto da amplificação referente à linhagem tipo-selvagem 1002 (controle positivo); canaleta 3: controle negativo.

4.4. Resistência das linhagens tipo-selvagem e mutante ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* a condições de estresse *in vitro*

Depois de confirmada a obtenção da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*, esta teve a sua resistência a diferentes condições de estresse *in vitro*, as quais representam uma tentativa de mimetização de algumas das diversas condições ambientais a que o microrganismo é normalmente submetido durante o curso da infecção do seu hospedeiro, avaliada a fim de se verificar se o seu fator sigma correspondente regula a expressão de genes cuja função é importante para a resposta adaptativa da bactéria a alguma dessas condições. Assim, a linhagem deficiente para o fator σ^H , o qual, além de contribuir para a virulência de *M. tuberculosis*, uma bactéria filogeneticamente próxima de *C. pseudotuberculosis* (Manganelli *et al.*, 2002; Bashyam & Hasnain, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2005), regula componentes importantes da resposta tanto desse microrganismo patogênico quanto de *C. glutamicum*, espécie não patogênica de crescente interesse como organismo modelo para espécies patogênicas proximamente relacionadas, aos estresses térmico e oxidativo (Raman *et al.*, 2001; Manganelli *et al.*, 2002; Bashyam & Hasnain, 2004;

Manganelli *et al.*, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2005; Rodrigue *et al.*, 2006; Ehira *et al.*, 2009; Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nešvera, 2010).

Assim, anteriormente à realização dos experimentos de resistência das linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* a condições de estresse *in vitro*, foi necessário fazer, para cada uma delas, uma curva de crescimento na qual a densidade óptica (DO₆₀₀) foi medida, em duplicata, de hora em hora por 15 horas a fim de se saber o perfil de crescimento de ambas as linhagens em caldo BHI. Através das medições de densidade óptica, cujos valores médios estão representados na figura 4.9, pode-se observar que as duas linhagens apresentam perfis de crescimento bastante similares neste meio de cultura rico em nutrientes, o que sugere que a mutação do gene *sigH* não levou a alterações no crescimento normal de *C. pseudotuberculosis*, assim como reportado para *M. tuberculosis* (Manganelli *et al.*, 2002; Bashyam & Hasnain, 2004) e para a linhagem mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* 1002, previamente produzida pelo nosso grupo de pesquisa (Pacheco, 2010). A partir daí, foi, então, possível avaliar a resistência da linhagem mutante $\Delta sigH$ em relação à resistência da linhagem tipo-selvagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* aos estresses ácido (pH 5,0), térmico (50 °C), oxidativo (H₂O₂ 70mM) e osmótico (NaCl 2,0M).

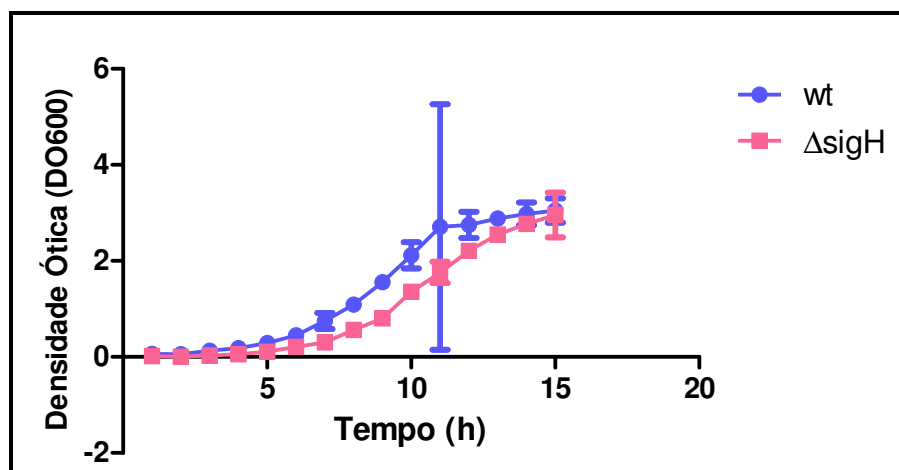


Figura 4.9: Curvas de crescimento das linhagens tipo-selvagem 1002 (wt) e mutante para o fator sigma alternativo σ^H ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* em caldo BHI.

4.4.1. Estresse ácido

A resistência ao ácido pode ser considerada como um fator que contribui para a sobrevivência da bactéria em ambientes cujo pH é baixo, como o fagolisossomo no interior

do macrófago (Figura 4.10), o que, por sua vez, contribui para a virulência de um organismo patogênico (Cotter & Hill, 2003) como *C. pseudotuberculosis*. Isso é verdade uma vez que os mecanismos que conferem esse fenótipo ao microrganismo permitem a geração de uma resposta aos impactos negativos da redução do pH citoplasmático, os quais podem incluir danos estruturais à membrana celular e à macromoléculas essenciais como o DNA e algumas proteínas e a perda da atividade de enzimas relativamente sensíveis ao ácido que atuam na via glicolítica, afetando severamente a habilidade da célula de produzir ATP (Cotter & Hill, 2003).

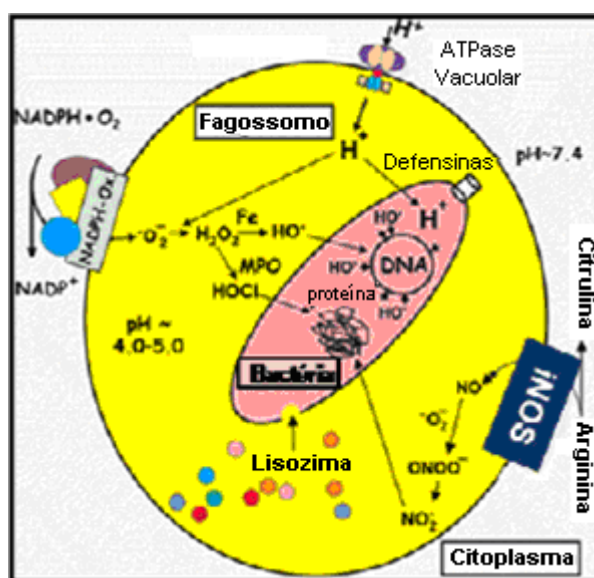


Figura 4.10: Diferentes condições de estresse encontradas por bactérias patogênicas no ambiente intrafagossômico. FONTE: Pacheco, 2010.

Em geral, a resistência ao ácido é dada por três principais estratégias: (I) mudanças na composição da membrana citoplasmática do microrganismo, (II) manutenção do pH interno da célula e (III) prevenção e/ou reparo de danos causados a componentes celulares essenciais (Choi *et al.*, 2000). Mais especificamente, em bactérias Gram-positivas, ela é devida à combinação de estratégias constitutivas e induzíveis que resultam em ações como a remoção de prótons (H^+) do ambiente intracelular, alcalinização do ambiente externo à célula, modificações na composição do envelope celular, produção de proteínas de choques gerais e chaperonas, expressão de reguladores transcricionais e respostas às mudanças na densidade da célula (Figura 4.11) (Cotter & Hill, 2003).

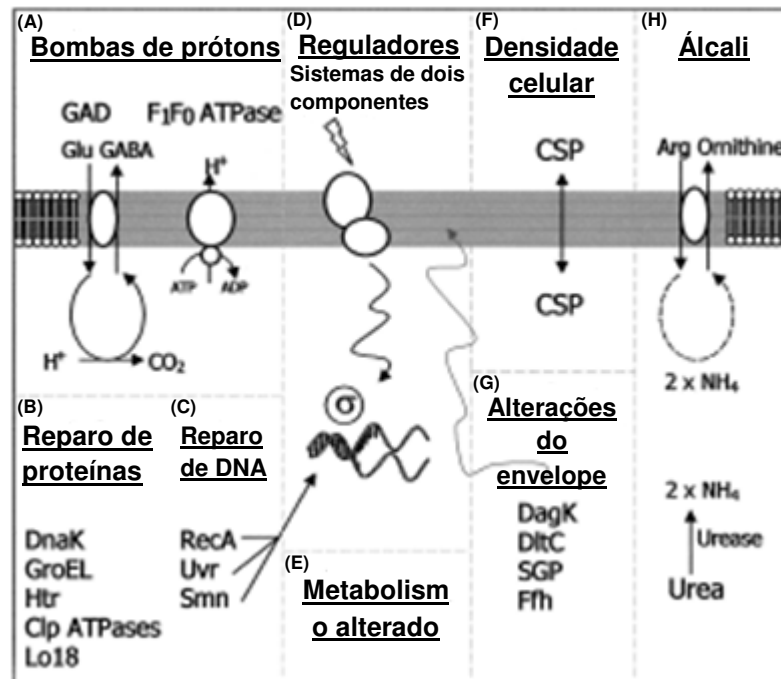


Figura 4.11: Representação dos mecanismos de resistência ao estresse ácido presentes em bactérias Gram-positivas. (A) Bombas de prótons como a F₁F₀ATPase ou a utilizada pelo sistema GAD contribui para o aumento do pH intracelular. (B) O reparo envolvendo chaperoninas, proteases e proteínas de choque térmico resultam na proteção de proteínas ou na sua degradação caso estas estejam danificadas. (C) O DNA danificado como uma consequência do baixo pH intracelular pode ser reparado por meio da excisão de bases lesadas/ mal pareadas ou do recomeço de forquilhas de replicação. (D) O envolvimento de reguladores como o 2CSs e os fatores sigma pode induzir respostas específicas ou globais. (E) Propriedades metabólicas podem ser alteradas. (F) A densidade celular afeta a comunicação entre as células. (G) Alterações no envelope celular podem proteger as células por meio da mudança da sua arquitetura, composição e estabilidade. (H) A produção de álcali pelo ADI ou pelo sistema urease aumenta o pH intracelular. **ADAPTADO E TRADUZIDO:** Cotter & Hill, 2003.

Assim, as linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* foram submetidas ao estresse ácido (pH 5,0) por um período de 4,5 horas, como descrito anteriormente, para que fosse possível testar se a expressão do fator sigma alternativo σ^H é uma das estratégias utilizadas por esta bactéria quando ela se depara com um ambiente cujo pH é baixo.

Nos gráficos representados abaixo (Figuras 4.12 e 4.13), pode-se observar que o estresse ácido (pH 5,0) afetou significativamente o crescimento tanto da linhagem tipo-

selvagem quanto o da linhagem mutante, pois, comparando-se o crescimento percentual de cada uma dessas linhagens quando expostas ao estresse com o crescimento percentual destas quando cultivadas em condições normais (controles) (Figura 4.13 A e B), é possível perceber que houve uma redução significativa do crescimento de ambas as linhagens para os tempos de 180 e 270 minutos. Além disso, pode-se observar que esse estresse afetou significativamente apenas a viabilidade da linhagem mutante uma vez que, comparando-se a viabilidade percentual de cada uma das duas linhagens em estudo quando expostas ao estresse com a viabilidade percentual destas quando cultivadas em condições normais (controles) (Figura 4.13 C e D) pode-se ver que houve uma redução significativa da viabilidade somente da linhagem $\Delta sigH$ para o tempo de 270 minutos.

No entanto, uma vez que o crescimento percentual relativo da linhagem tipo-selvagem foi comparado com o crescimento percentual relativo da linhagem mutante (Figura 4.14 A) e a viabilidade percentual relativa da linhagem tipo-selvagem foi comparada com a viabilidade percentual relativa da linhagem mutante (Figura 4.14 B) quando estas foram expostas ao estresse ácido, não foi possível observar nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os valores de porcentagem obtidos para cada um dos tempos em que as medições foram feitas.

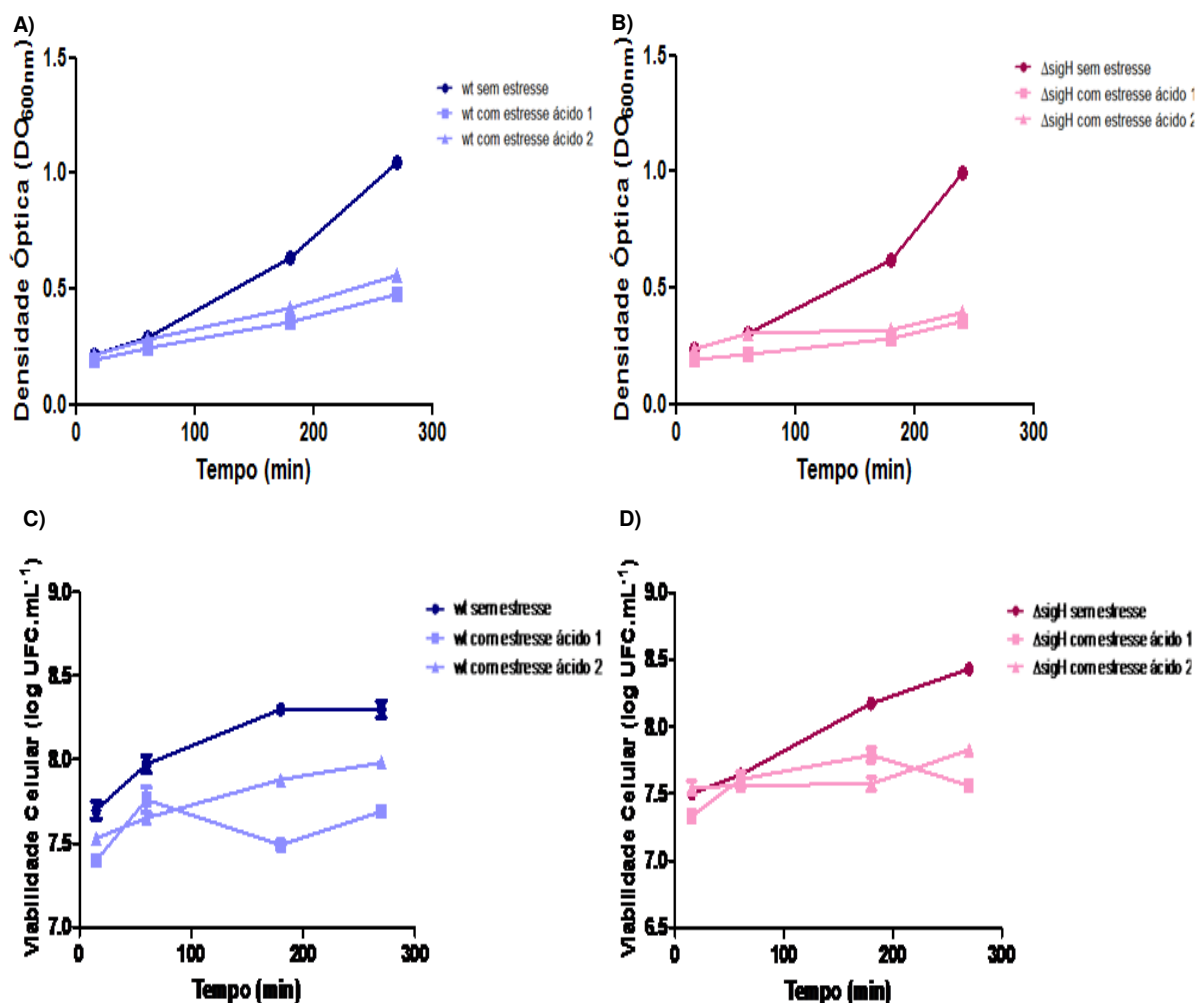


Figura 4.12: Curvas de crescimento e viabilidade das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H (ΔsigH) quando foram expostas ao agente causador do estresse ácido (pH 5,0) em duplicata e quando crescidas em condições normais (sem estresse). (A e C) Linhagem tipo-selvagem 1002. (B e D) Linhagem mutante para o fator sigma H. As curvas representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

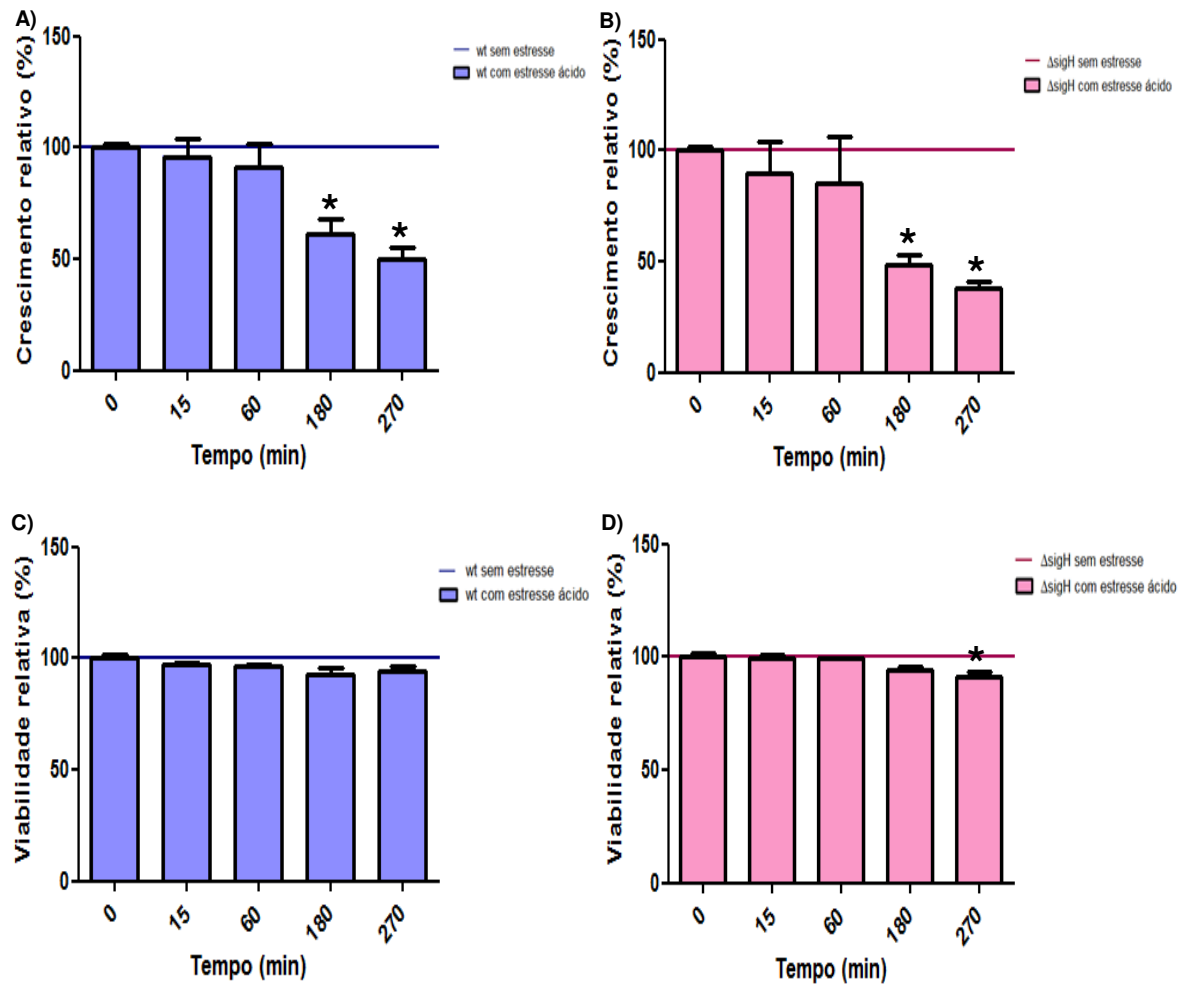


Figura 4.13: Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta sigH$) quando expostas ao agente causador do estresse ácido (pH 5,0) com o crescimento e a viabilidade percentuais das mesmas quando cultivadas em condições normais (sem estresse). (A e C) Linhagem tipo-selvagem 1002. (B e D) Linhagem mutante para o fator sigma H. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student. As barras e as retas representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

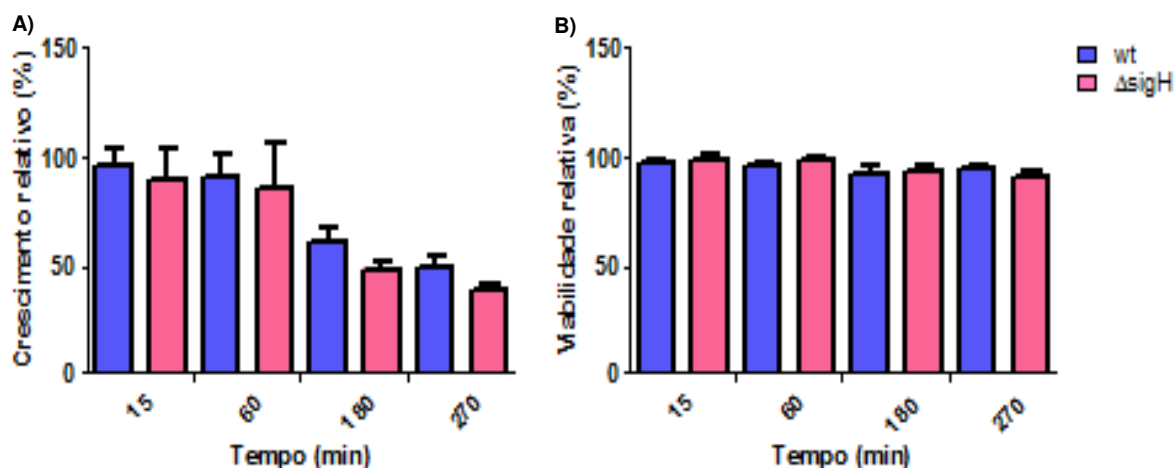


Figura 4.14: Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais relativos da linhagem 1002 selvagem (wt) com o crescimento e a viabilidade percentuais relativos da linhagem mutante para o fator σ^H ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* quando estas foram expostas ao agente causador do estresse ácido (pH 5,0). (A) Comparação do crescimento percentual relativo. (B) Comparação da viabilidade percentual relativa. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student. As barras representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

Isso pode ser devido ao fato de que, aparentemente, o fator σ^H de *C. pseudotuberculosis* não é o responsável direto pela regulação de genes que respondem ao estresse ácido. Entretanto, há a possibilidade de tal fator sigma alternativo regular a transcrição de outros reguladores que participam da resposta adaptativa de certos microrganismos ao ambiente ácido, como o gene estrutural do fator sigma alternativo σ^B (Cotter & Hill, 2003; Kazmierczak *et al.*, 2005; Larisch *et al.*, 2007; Pátek & Nesvřa, 2010), o que poderia ser testado, dentre outras técnicas, por meio da comparação da resposta ao estresse ácido de um duplo-mutante $\Delta sigB$ - $\Delta sigH$ com as respostas dos mutantes $\Delta sigB$ e $\Delta sigH$ para se verificar a possibilidade de ocorrência de algum tipo de sinergismo. Essa hipótese se torna viável uma vez que o gene *sigB* de *C. glutamicum* R, o qual apresenta 79% de identidade de nucleotídeos e 91% de identidade de aminoácidos com o gene *sigB* de *C. pseudotuberculosis*, é regulado pelo fator σ^H (Ehira *et al.*, 2009) cujo gene estrutural, por sua vez, apresenta 75% de identidade de nucleotídeos e 77% de identidade de aminoácidos com o gene *sigH* de *C. pseudotuberculosis*. Além disso, o fator σ^B de *Brevibacterium flavum* cujo papel na resposta desta bactéria ao estresse ácido foi experimentalmente comprovado (Halgasova *et al.*, 2002), possui 79% de identidade de nucleotídeos e 91% de identidade de aminoácidos com o fator σ^B de *C. pseudotuberculosis*.

4.4.2. Estresse térmico

Temperaturas apenas moderadamente acima do ponto de crescimento ótimo representam um desafio para a sobrevivência de qualquer ser vivo, tornando o calor um dos principais agentes causadores de estresse. A resposta ao choque térmico, portanto, é ativada por um aumento de poucos graus Celsius (°C) na temperatura, o que pode causar, dentre outras coisas, desdobramento, emaranhamento e agregação inespecífica de proteínas. Esses efeitos, juntos, são capazes de impedir o progresso do ciclo celular, resultando, por sua vez, na estagnação do crescimento do organismo. Ademais, dependendo da duração e da severidade do estresse térmico a que um organismo é submetido, é possível que o acúmulo de tais efeitos deletérios resulte na morte celular (Richter *et al.*, 2010).

Todos os organismos respondem a um aumento repentino de temperatura com o aumento da expressão de um grupo de proteínas altamente conservadas denominadas proteínas de choque térmico – HSPs, do inglês *heat shock proteins*. Essa resposta, por sua vez, é controlada por uma combinação de fatores sigma alternativos, os quais reconhecem promotores de genes de choque térmico específicos, e reguladores transcricionais, que agem como repressores ou ativadores de certos genes de choque térmico ao se ligarem à região promotora de tais genes específicos (Ehira *et al.*, 2009).

Desse modo, para que fosse possível testar se a expressão do fator sigma alternativo σ^H é uma das estratégias utilizadas por *C. pseudotuberculosis* quando ela se depara com um ambiente cuja temperatura está acima do seu ponto de crescimento ótimo, as linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante $\Delta sigH$ foram submetidas ao estresse térmico (50°C) por um período de 4,5 horas, como descrito anteriormente.

Nos gráficos representados abaixo (Figuras 4.15 e 4.16), pode-se observar que o estresse térmico (50°C) afetou significativamente o crescimento tanto da linhagem tipo-selvagem quanto o da linhagem mutante, pois, comparando-se o crescimento percentual de cada uma dessas linhagens quando expostas ao estresse com o crescimento percentual destas quando cultivadas em condições normais (controles) (Figura 4.16 A e B), é possível perceber que houve uma redução significativa do crescimento de ambas as linhagens para os tempos de 60, 180 e 270 minutos. Além disso, pode-se observar que esse estresse também afetou significativamente a viabilidade tanto da linhagem tipo-selvagem quanto a da linhagem mutante uma vez que, comparando-se a viabilidade percentual de cada uma das duas linhagens em estudo quando expostas ao estresse com a viabilidade percentual destas

quando cultivadas em condições normais (controles) (Figura 4.16 C e D), pode-se ver que houve uma redução significativa da viabilidade de ambas as linhagens para os tempos de 180 e 270 minutos.

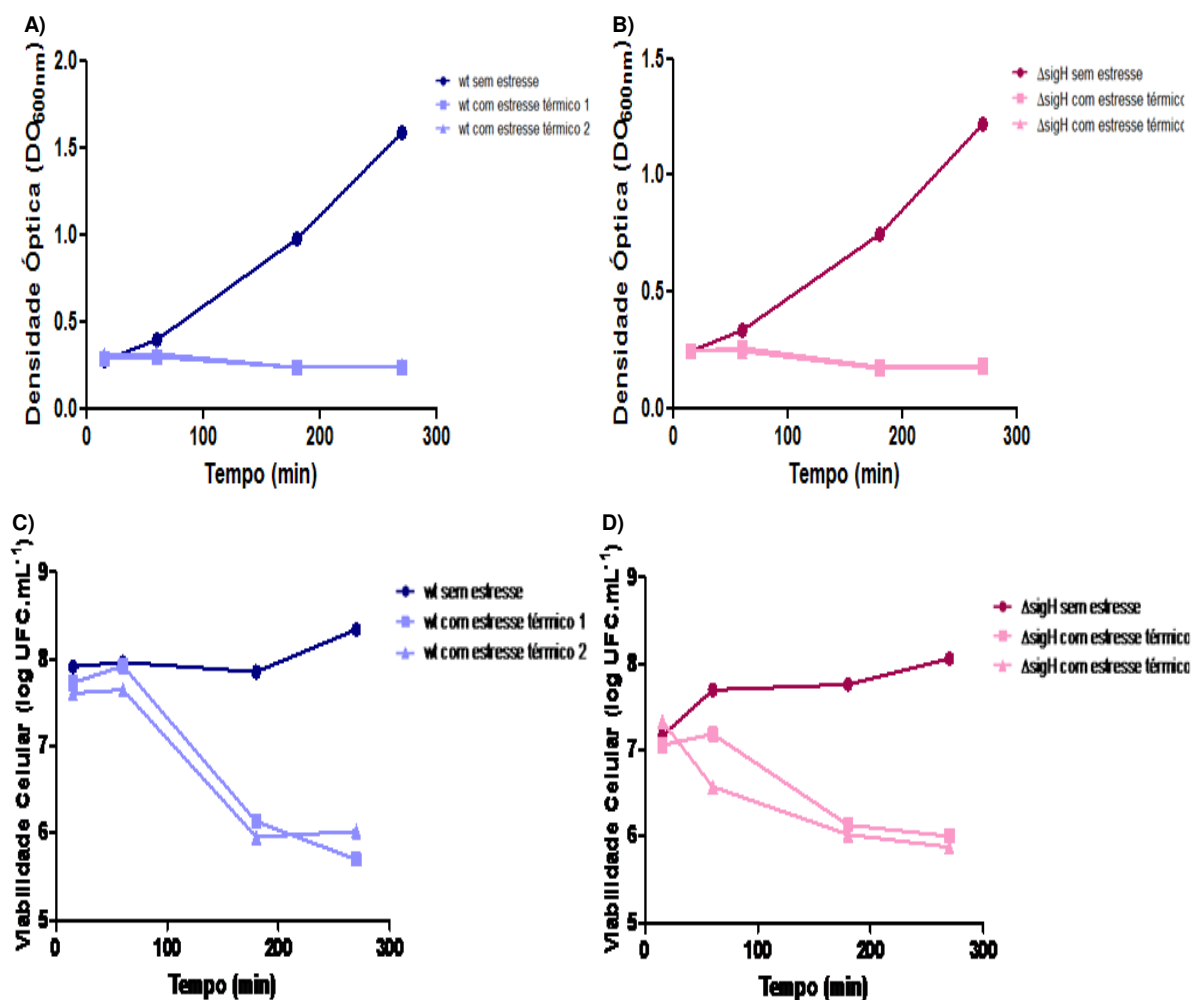


Figura 4.15: Curvas de crescimento e viabilidade das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta sigH$) quando foram expostas ao agente causador do estresse térmico (50°C) em duplicata e quando crescidas em condições normais (sem estresse). (A e C) Linhagem tipo-selvagem 1002. (B e D) Linhagem mutante para o fator sigma H. As curvas representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

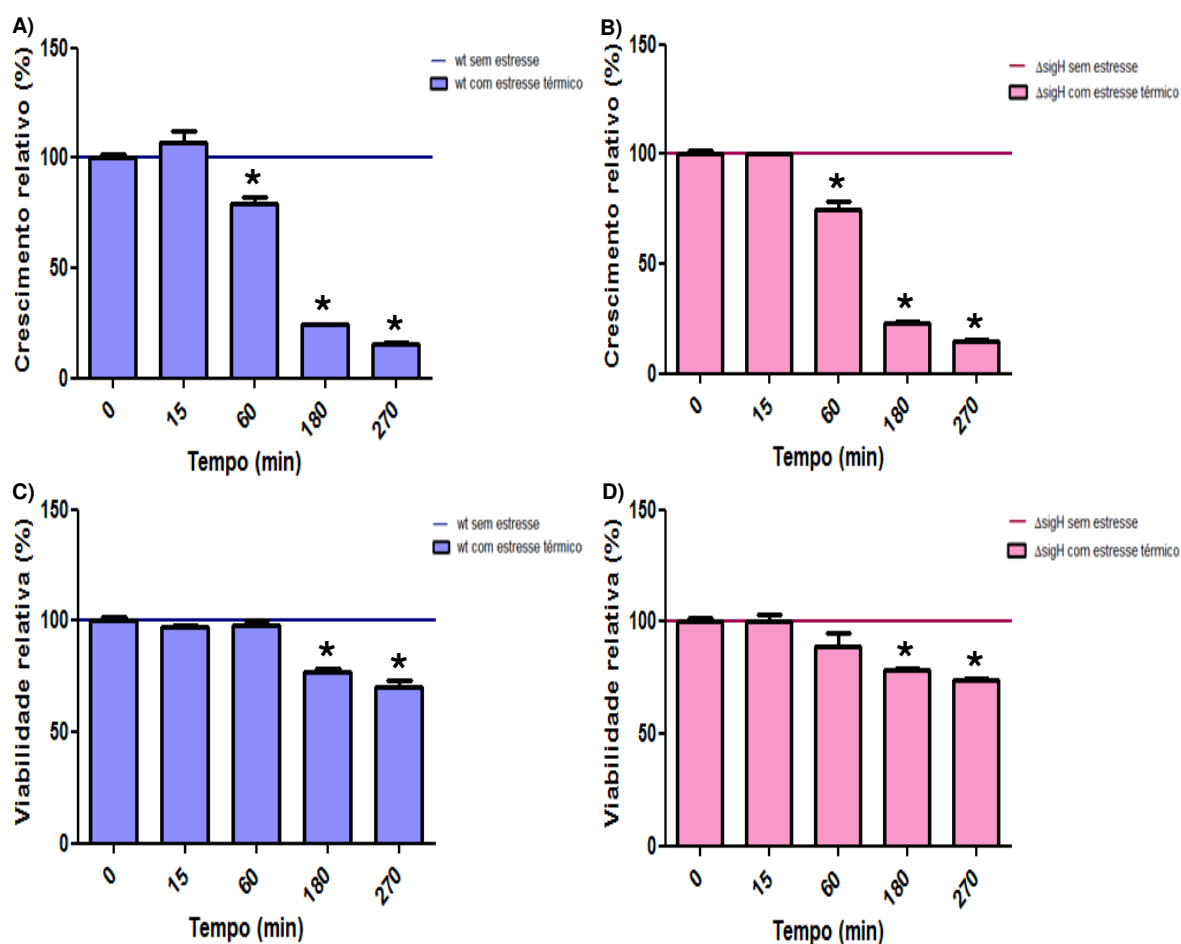


Figura 4.16: Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta sigH$) quando expostas ao agente causador do estresse térmico (50°C) com o crescimento e a viabilidade percentuais das mesmas quando cultivadas em condições normais (sem estresse). (A e C) Linhagem tipo-selvagem 1002. (B e D) Linhagem mutante para o fator sigma H. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student. As barras e as retas representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

Porém, assim como para o estresse ácido, uma vez que o crescimento percentual relativo da linhagem tipo-selvagem foi comparado com o crescimento percentual relativo da linhagem mutante (Figura 4.17 A) e a viabilidade percentual relativa da linhagem tipo-selvagem foi comparada com a viabilidade percentual relativa da linhagem mutante (Figura 4.17 B) quando estas foram expostas ao estresse térmico, não foi possível observar nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os valores de porcentagem obtidos para cada um dos tempos em que as medições foram feitas.

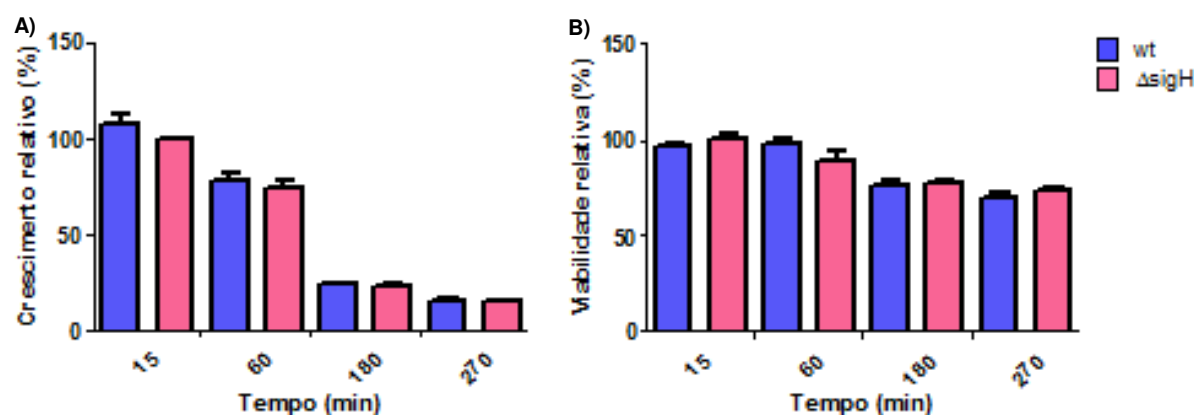


Figura 4.17: Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais relativos da linhagem 1002 selvagem (wt) com o crescimento e a viabilidade percentuais relativos da linhagem mutante para o fator σ^H (ΔsigH) de *C. pseudotuberculosis* quando estas foram expostas ao agente causador do estresse térmico (50°C). (A) Comparação do crescimento percentual relativo. (B) Comparação da viabilidade percentual relativa. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student. As barras representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

Esse resultado, possivelmente, é devido ao fato de que outros fatores sigma alternativos, como o σ^B (70% de identidade de nucleotídeos e 80% de identidade de aminoácidos com o σ^B de *M. tuberculosis*), o σ^E (77% de identidade de nucleotídeos e 86% de identidade de aminoácidos com o σ^E de *C. glutamicum* ATCC 13032 e 71% de identidade de nucleotídeos e 68% de identidade de aminoácidos com o de *M. tuberculosis* H37Rv) e o σ^M (42% de identidade de aminoácidos com o σ^M de *C. glutamicum* e 33% de identidade de aminoácidos com o de *M. tuberculosis*), que atuam na resposta ao estresse térmico (Manganelli *et al.*, 2002; Manganelli *et al.*, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2005; Rodrigue *et al.*, 2006; Larisch *et al.*, 2007; Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nesvĕra, 2010), ainda são encontrados em sua forma funcional dentro das células do mutante deficiente para o fator σ^H e, por isso, são capazes de regular direta e indiretamente a expressão de vários genes de choque térmico.

Ademais, é possível que mais de um fator sigma, dentre eles o σ^H , seja capaz de reconhecer um único promotor dentro de uma dada região promotora ou, ainda, que diferentes fatores sigma possam reconhecer diferentes promotores numa mesma região promotora de genes de choque térmico. Um exemplo disso é que, em *C. glutamicum*, há evidências de que, para alguns genes, as seqüências consenso dos promotores específicos para os fatores σ^H e σ^M são praticamente idênticos, o que quer dizer que a RNAP+ σ^H e a RNAP+ σ^M podem vir a reconhecer os mesmos promotores dependendo de uma condição específica, a qual pode ser, dentre outras, o estresse térmico (Pátek & Nesvĕra, 2010). Além

disso, também para *C. glutamicum*, dois operons de choque térmico, *clpB* (75% de identidade de nucleotídeos e 97% de identidade de aminoácidos com o gene *clpB* de *C. pseudotuberculosis*) e *dnaK* (84% de identidade de nucleotídeos e 91% de identidade de aminoácidos com o gene *dnaK* de *C. pseudotuberculosis*), os quais são regulados positivamente pelo fator σ^H , foram induzidos tanto na linhagem tipo-selvagem quanto na linhagem mutante $\Delta sigH$ após estas serem submetidas ao estresse térmico. Todavia, os níveis de indução dos operons foram menores no mutante. Então, por meio do uso da técnica de RACE-PCR (do inglês *rapid amplification of cDNA ends*-PCR), foram identificados um promotor proximal à região 5' dos genes *clpB* e *dnaK* dependente do fator σ^H e um distal aparentemente dependente do fator sigma primário σ^A (79% de identidade de nucleotídeos e 97% de identidade de aminoácidos com o gene *sigA* de *C. pseudotuberculosis*). Isso, por sua vez, quer dizer que é provável que a indução dos operons *clpB* e *dnaK* pelo estresse térmico é devida à desrepressão do promotor dependente do fator σ^A e à ativação do promotor dependente do fator σ^H (Ehira *et al.*, 2009; Pátek & Nesvĕra, 2010).

4.4.3. Estresse oxidativo

O oxigênio é indispensável para a maioria dos organismos vivos, sendo que, com a exceção das bactérias anaeróbicas, todos dependem da sua presença no ambiente para a geração de energia, na forma de ATP, durante um processo chamado de fosforilação oxidativa (Lushechak, 2001).

A fosforilação oxidativa, sendo num organismo eucarioto ou procarioto (aeróbio estrito ou facultativo), está associada com a redução de moléculas de O_2 em H_2O (Lushechak, 2001), como demonstrado na figura 4.18. Entretanto, apesar desse processo, normalmente, resultar na redução completa do O_2 , a sua redução univalente pode ocorrer, permitindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*) como o superóxido (O_2^-)¹, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^*) (Hassett & Cohen, 1989).

Nesse caso, quando a formação de ROS se dá no contexto do metabolismo do próprio organismo, ela é referida como estresse oxidativo “endógeno”. Todavia, alguns organismos, como as bactérias, podem ser submetidos a condições ambientais nas quais ROS exógenas são geradas, sendo, o exemplo mais importante desse estresse “exógeno”, o ataque de bactérias patogênicas pelas células fagocíticas (Hassett & Cohen, 1989).

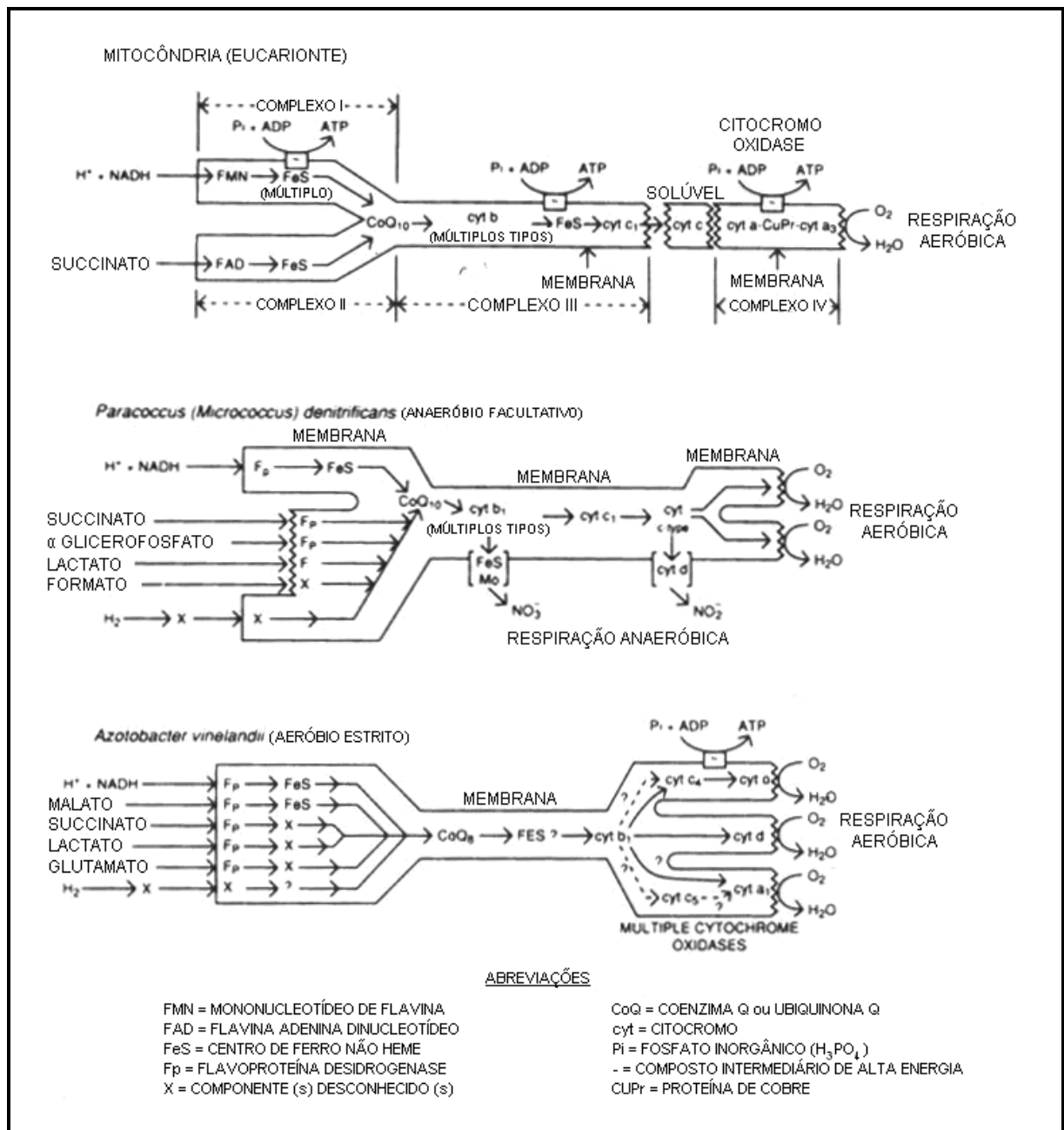


Figura 4.18: Esquema do processo de fosforilação oxidativa que ocorre nas cadeias transportadoras de elétrons de organismos eucariotos e procariotos (aeróbios estritos e facultativos). ADAPTADO E TRADUZIDO: Jurtshuk, 1996.

A cadeia transportadora de elétrons das células fagocíticas – como os neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos – é consideravelmente diferente daquela de outros tipos celulares uma vez que, nas primeiras, cada um dos componentes que integram essa cadeia precisam ser, individualmente, agregados à membrana, requerendo vários passos para a sua ativação. Além disso, esses fagócitos têm uma capacidade memorável de gerar $(O_2^-)^1$ através da transferência de um elétron proveniente de um NADPH para uma molécula

de O_2 , sendo que, subsequente à formação de $(O_2^-)^1$, uma variedade de ROS intermediárias são produzidas. Estas, por sua vez, são as que possuem o maior efeito antimicrobiano (Hassett & Cohen, 1989).

Os alvos biológicos dessas ROS são o DNA, o RNA, as proteínas e os lipídeos (Figura 4.19). Com relação aos danos que podem ser causados ao DNA, é possível que essas espécies ataquem tanto as bases nitrogenadas quanto as moléculas de açúcar (desoxirribose), resultando, assim, em quebras no arcabouço açúcar-fosfato, na formação de adutos de bases e açúcar, em ligações cruzadas do DNA com outras moléculas e em outras lesões que bloqueiam a replicação do DNA. Já os danos que podem ser causados às proteínas incluem a oxidação de grupamentos sulfidríla, a redução de dissulfetos, a adução de resíduos de aminoácidos, a reação de proteínas com aldeídos, a modificação de grupos prostéticos ou de *clusters* de metais, a ligação cruzada entre proteínas e a fragmentação de peptídeos. Além disso, as ROS podem atacar os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana citoplasmática, levando à peroxidação desses lipídeos. Esse evento, por sua vez, reduz a fluidez da membrana, o que pode, ainda, resultar na liberação das proteínas integradas a ela (Cabiscol *et al.*, 2000).

Todas essas modificações citadas acima são consideradas deletérias para as células bacterianas e, por isso, a sua sobrevivência depende da evolução de uma série de mecanismos de defesa (Cabiscol *et al.*, 2000), os quais podem ser divididos em três grupos: (i) prevenção da geração das ROS; (ii) impedimento da propagação das ROS; e (iii) reparo de danos (Lushechak, 2001). Ademais, a resposta bacteriana ao estresse oxidativo não é estática, podendo ser regulada coordenadamente (Hassett & Cohen, 1989) por vários reguladores da expressão gênica, como os fatores sigma.

Assim, com a finalidade de se testar a hipótese da expressão do fator sigma alternativo σ^H ser uma das estratégias utilizadas por *C. pseudotuberculosis* quando ela se depara com um ambiente no qual ela é submetida ao estresse oxidativo, como o interior dos macrófagos, as linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante $\Delta sigH$ foram submetidas a esse estresse (H_2O_2 70mM) por um período de 4,5 horas, como descrito anteriormente.

Nos gráficos representados abaixo (Figuras 4.20 e 4.21), pode-se observar que o estresse oxidativo (H_2O_2 70mM) afetou significativamente o crescimento tanto da linhagem tipo-selvagem quanto o da linhagem mutante, pois, comparando-se o crescimento percentual de cada uma dessas linhagens quando expostas ao estresse com o crescimento percentual destas quando cultivadas em condições normais (controles) (Figura 4.21 A e B), é possível perceber que houve uma redução significativa do crescimento de ambas as linhagens para os tempos de 15, 60, 180 e 270 minutos. Além disso, pode-se observar que esse estresse também afetou significativamente a viabilidade tanto da linhagem tipo-selvagem quanto a da linhagem mutante uma vez que, comparando-se a viabilidade percentual de cada uma das duas linhagens em estudo quando expostas ao estresse com a viabilidade percentual destas quando cultivadas em condições normais (controles) (Figura 4.21 C e D), pode-se ver que houve uma redução significativa da viabilidade de ambas as linhagens para os tempos de 15, 60, 180 e 270 minutos.

Todavia, assim como para os outros dois estresses já discutidos, uma vez que o crescimento percentual relativo da linhagem tipo-selvagem foi comparado com o crescimento percentual relativo da linhagem mutante (Figura 4.22 A) e a viabilidade percentual relativa da linhagem tipo-selvagem foi comparada com a viabilidade percentual relativa da linhagem mutante (Figura 4.22 B) quando foram expostas ao estresse oxidativo, não foi possível observar nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os valores de porcentagem obtidos para cada um dos tempos em que as medições foram feitas.

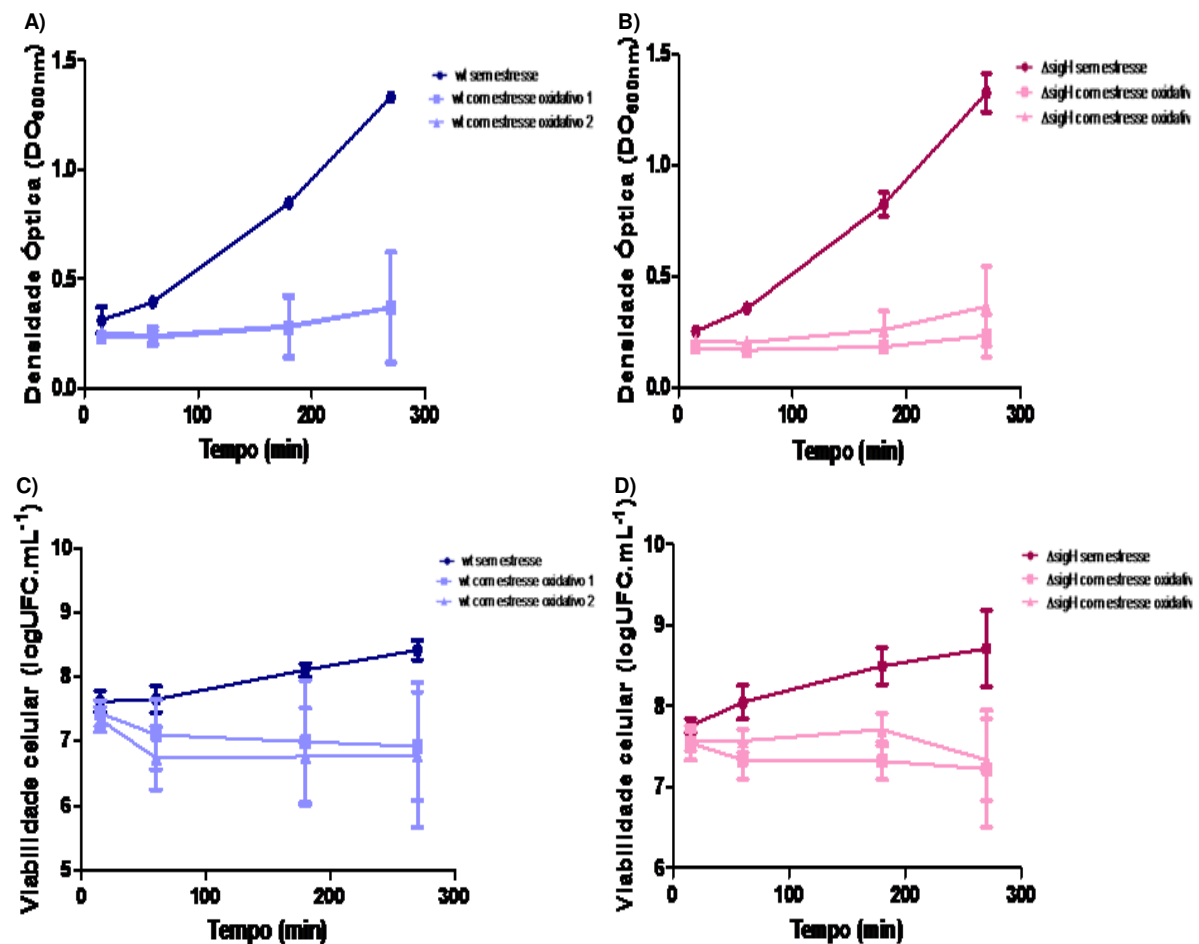


Figura 4.20: Curvas de crescimento e viabilidade das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H ($\Delta sigH$) quando foram expostas ao agente causador do estresse oxidativo (H_2O_2 70mM) em duplicata e quando crescidas em condições normais (sem estresse). (A e C) Linhagem tipo-selvagem 1002. (B e D) Linhagem mutante para o fator sigma H. As curvas representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

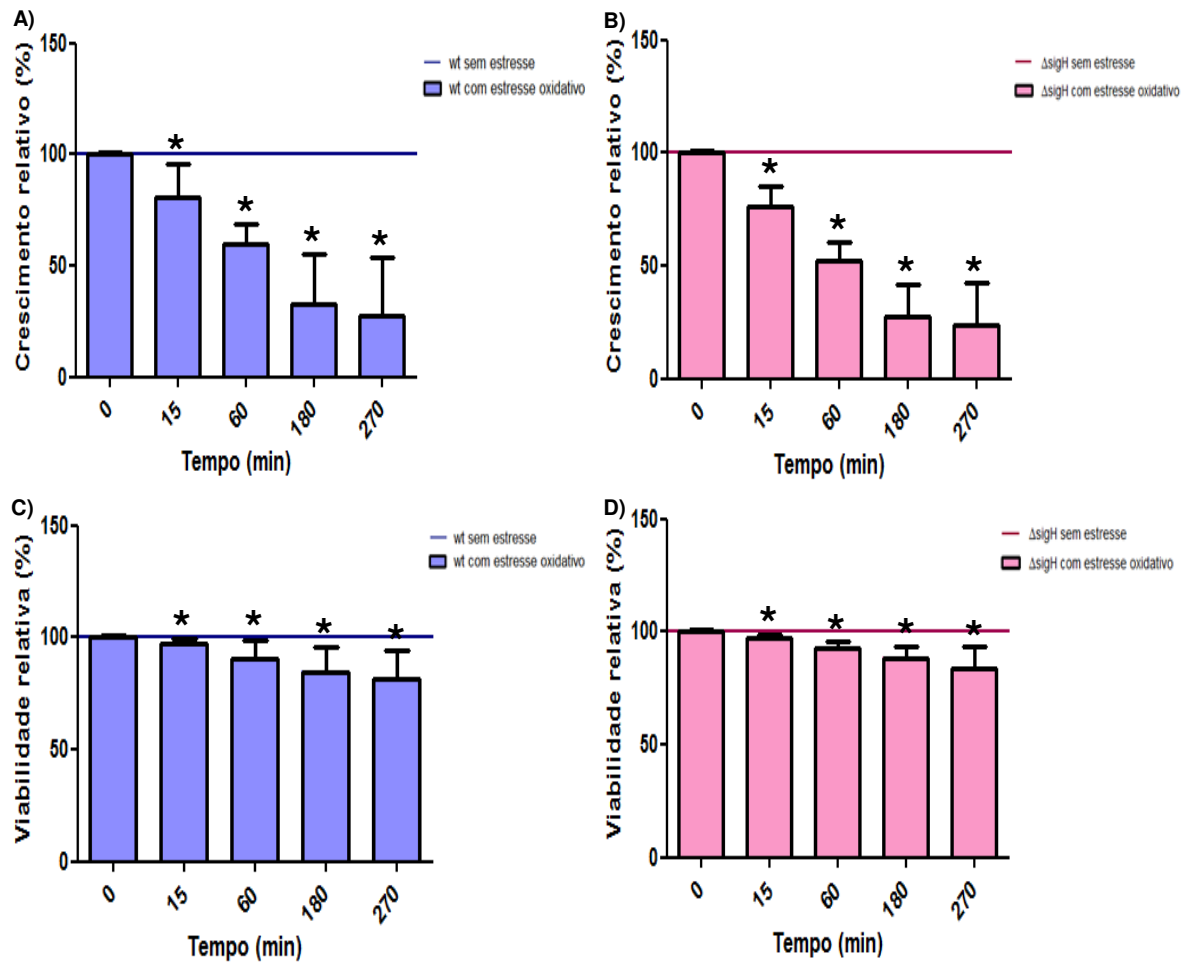


Figura 4.21: Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H (ΔsigH) quando expostas ao agente causador do estresse oxidativo (H₂O₂ 70mM) com o crescimento e a viabilidade percentuais das mesmas quando cultivadas em condições normais (sem estresse). (A e C) Linhagem tipo-selvagem 1002. (B e D) Linhagem mutante para o fator sigma H. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student. As barras e as retas representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

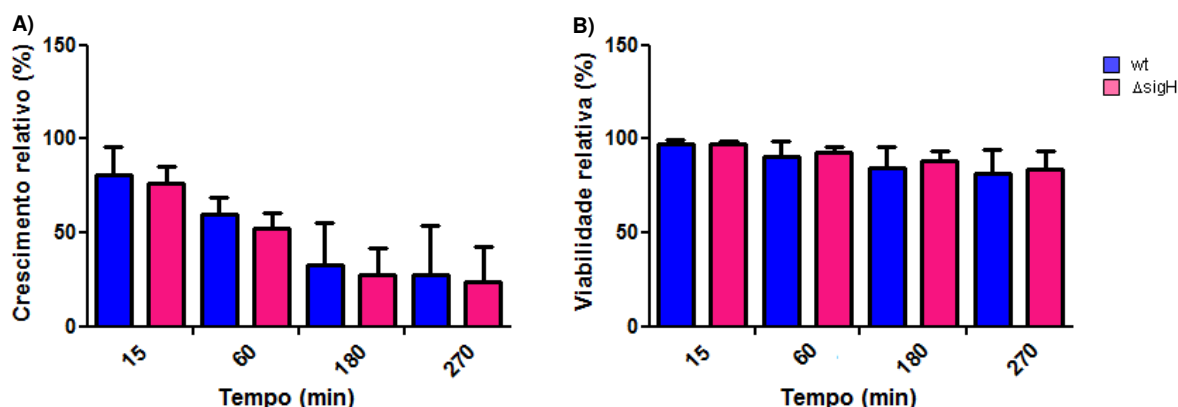


Figura 4.22: Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais relativos da linhagem 1002 selvagem (wt) com o crescimento e a viabilidade percentuais relativos da linhagem mutante para o fator σ^H ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* quando estas foram expostas ao agente causador do estresse oxidativo (H_2O_2 70mM). (A) Comparação do crescimento percentual relativo. (B) Comparação da viabilidade percentual relativa. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student. As barras representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

Esses resultados, provavelmente, são devidos ao fato de que outros fatores sigma alternativos, como o σ^B , o pouco estudado σ^C (74% de identidade de nucleotídeos e 51% de identidade de aminoácidos com o σ^C de *M. tuberculosis* H37Rv); o σ^E e o σ^M , cuja atuação na resposta ao estresse oxidativo já foi demonstrada em vários organismos, como *M. tuberculosis* e *C. glutamicum* (Manganelli *et al.*, 2004; Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nesvĕra, 2010), ainda são encontrados em sua forma funcional no mutante $\Delta sigH$, sendo capazes, assim, de regular direta e indiretamente a expressão de vários genes relacionados a esse estresse.

Além disso, situações em que mais de um fator sigma, dentre eles o σ^H , é capaz de reconhecer um único promotor dentro de uma dada região promotora ou, ainda, situações em que diferentes fatores sigma podem reconhecer diferentes promotores numa mesma região promotora de genes que atuam na resposta ao estresse oxidativo parece ser bastante comum. Um exemplo disso é que, em *C. glutamicum*, há evidências de que, para os genes *trxB* (74% de identidade de nucleotídeos e 74% de identidade de aminoácidos com o gene *trxB* de *C. pseudotuberculosis*), *trxC* (75% de identidade de nucleotídeos e 75% de identidade de aminoácidos com o gene *trxC* de *C. pseudotuberculosis*) e *sufR* (62% de identidade de aminoácidos com o gene *sufR* de *C. pseudotuberculosis*), os quais estão relacionados à resposta dessa espécie bacteriana ao estresse dissulfeto – um tipo de estresse oxidativo, as seqüências -35 (GGAA) e -10 (GTT) da região promotora foram reconhecidas como sendo dependentes tanto do fator σ^H quanto do fator σ^M . Desse modo, uma vez que as seqüências consenso dos promotores específicos para os fatores σ^H e σ^M

são praticamente idênticos, é proposto que tanto a RNAP+ σ^H quanto a RNAP+ σ^M podem vir a reconhecer os mesmos promotores, dependendo de uma condição específica que, neste caso, é o estresse oxidativo. Ademais, apoiando essa hipótese está o fato de que vários genes cuja transcrição é ativada pelo σ^H ainda são transcritos, em níveis menores, no mutante $\Delta sigH$, o que sugere que outro fator sigma, como o σ^M , reconhece a mesma região promotora e, assim, é capaz de regular a transcrição dos mesmos (Pátek & Nesvĕra, 2010).

4.4.4. Estresse osmótico

As bactérias possuem várias proteínas de membrana que são sensíveis a estímulos físicos externos, os quais, por sua vez, têm os seus sinais transduzidos através da célula bacteriana (Krämer, 2009), sendo o estresse osmótico um dos causadores mais importantes desse tipo de estímulo, o qual tem um impacto direto no volume da célula e, conseqüentemente, na sua forma e nas suas funções fisiológicas (Krämer, 2010).

As células bacterianas são freqüentemente submetidas tanto ao estresse hiposmótico (baixa osmolalidade externa) quanto ao estresse hiperosmótico (alta osmolalidade externa). O primeiro leva ao influxo imediato de água, sendo que o microrganismo reage a essa situação por meio da abertura instantânea de canais mecanossensíveis; e o segundo, por outro lado, leva ao efluxo imediato de água, levando a bactéria a aumentar os níveis de pequenos solutos, os quais são osmoticamente ativos, no citoplasma (Krämer, 2009). Tais solutos, chamados de solutos compatíveis, cobrem uma gama de substâncias como, por exemplo, aminoácidos (prolina) e seus derivados (betaína e ectoína), oligossacarídeos (trealose) e heterosídeos (glicosilglicerol) (Krämer, 2009; 2010).

Ademais, pode-se dizer que, de um modo geral, a resposta bacteriana ao estresse osmótico engloba duas estratégias diferentes (Krämer, 2009; 2010), mas complementares (Figura 4.23). De um lado estão as respostas imediatas, as quais levam de segundos a pouquíssimos minutos para serem ativadas, que ocorrem em nível de atividade protéica e são mediadas por enzimas e sistemas de transporte celular (Krämer, 2009; 2010). Do outro lado estão as respostas tardias, que levam de vários minutos a horas para serem ativadas, nas quais as bactérias reagem em nível de transcrição e de tradução por meio da síntese *de novo* de enzimas, sistemas de transporte e componentes da parede celular (Krämer, 2009; 2010). Estas, por sua vez, têm como objetivo o restabelecimento da fisiologia da célula, normalizando, assim, a composição e a concentração de solutos internos, o metabolismo energético e a divisão celular (Krämer, 2010).

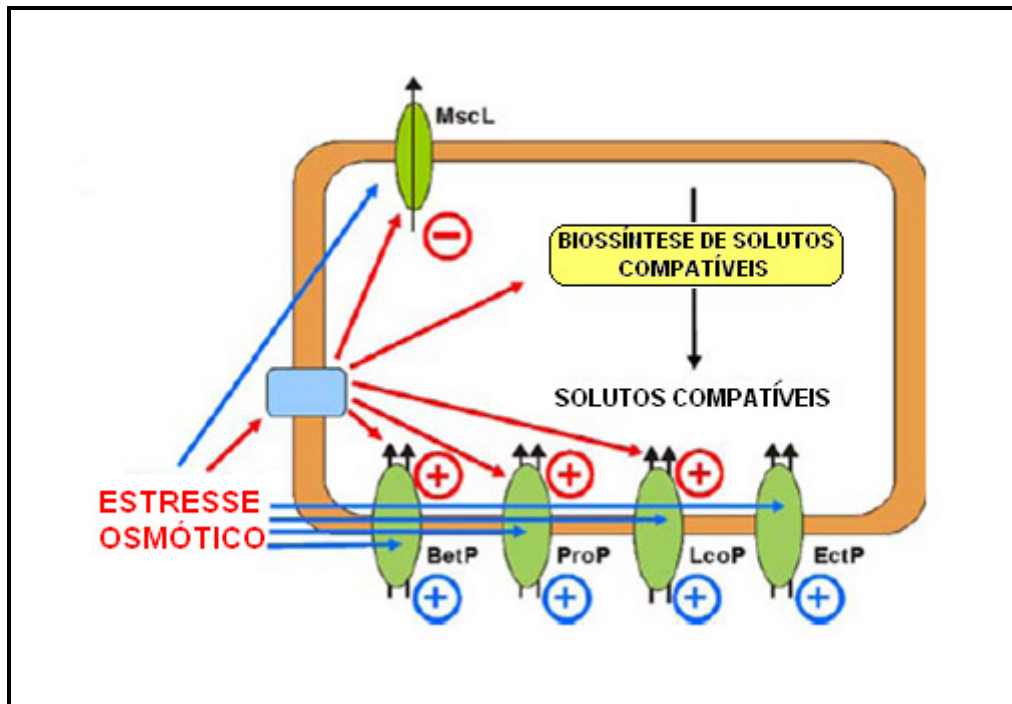


Figura 4.23: Esquema geral da percepção do estímulo e da transdução de sinais em resposta aos estresses hipo e hiperosmótico em *C. glutamicum*. O estresse osmótico leva à regulação tanto no nível da transcrição gênica (setas vermelhas) quanto no nível da atividade protéica (setas azuis) de sistemas de absorção de solutos compatíveis (BetP, EctP, ProP e LcoP), de sistemas mecanossensíveis de efluxo de solutos (MscL) e de biossíntese de solutos compatíveis. **ADAPTADO E TRADUZIDO:** Krämer, 2009.

C. glutamicum, uma das bactérias filogeneticamente próximas de *C. pseudotuberculosis* já citadas, apresenta, como protagonistas da sua resposta imediata ao estresse hiperosmótico, quatro sistemas de absorção de solutos compatíveis, dentre os cinco existentes: BetP (69% de identidade de nucleotídeos com o gene *betP* e de aminoácidos com a proteína BetP de *C. pseudotuberculosis*), EctP (68% de identidade de nucleotídeos com o gene *ectP* e 71% de identidade de aminoácidos com a proteína EctP de *C. pseudotuberculosis*), ProP e LcoP (Krämer, 2009) (Figura 4.23). Destes, o sistema mais ativo e melhor estudado é o da BetP (Figura 4.24), a qual é uma proteína de membrana formada por 595 aminoácidos, que catalisa o simporte de uma glicina betaína mais dois íons Na^+ (Krämer, 2010).

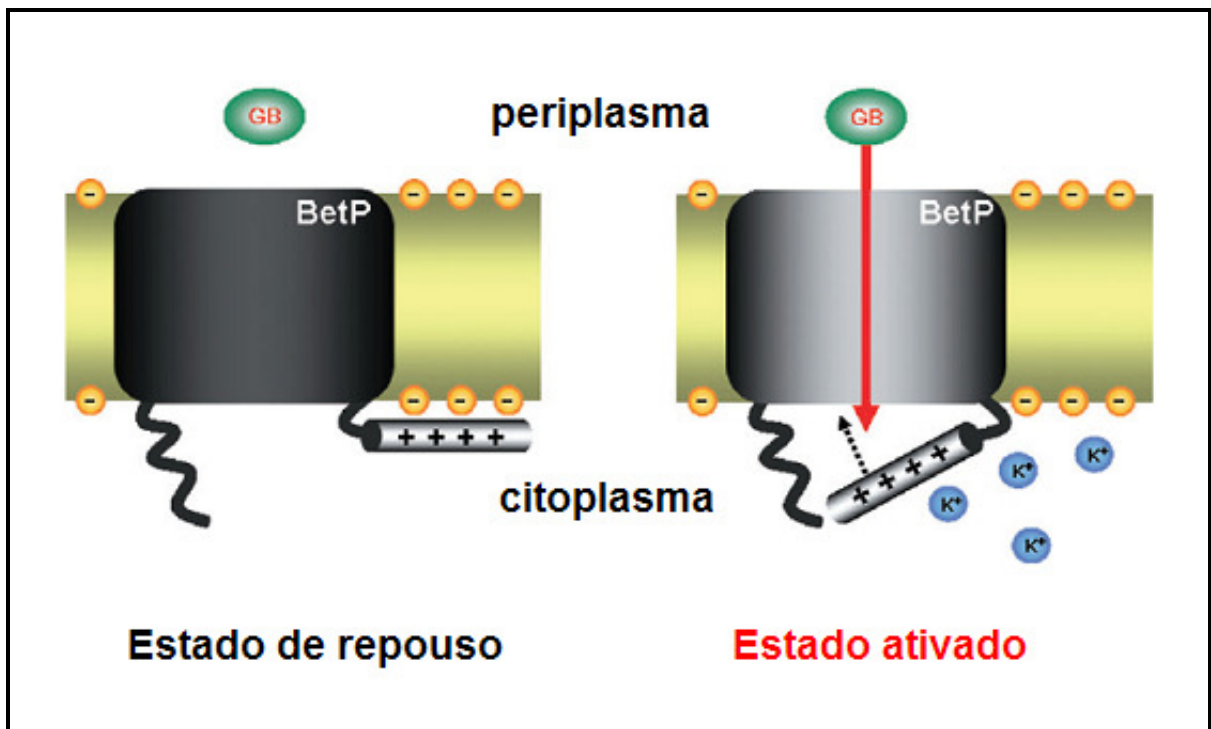


Figura 4.24: Representação esquemática do comportamento do sistema de absorção BetP durante a resposta de *C. glutamicum* ao estresse hiperosmótico. Em seu estado de repouso, o domínio C-terminal da proteína está, supostamente, em contato com a superfície citoplasmática da membrana plasmática bacteriana, o que mantém a BetP inativa. Quando ocorre o aumento da osmolalidade do meio externo, a concentração citoplasmática de K^+ também aumenta, o que leva à separação do domínio C-terminal da BetP da superfície a qual ele estava ligado. Essa mudança conformacional é, então, transmitida para o resto da proteína, resultando na ativação do transporte de glicina betaína (GB). **ADAPTADO E TRADUZIDO:** Krämer, 2010.

Além disso, *C. glutamicum* também apresenta 13 sistemas de transdução de sinais de dois componentes, os quais são capazes de modificar a regulação da transcrição e da tradução de certos grupos de genes, sendo que, destes, o sistema MtrAB (Figura 4.25) foi identificado como um dos mais relevantes para a resposta dessa bactéria ao estresse hiperosmótico, contribuindo com a ativação de genes como aqueles para três dos quatro sistemas supracitados (BetP, ProP e LcoP), além de estar relacionado com a biossíntese de componentes da parede celular (Krämer, 2009; 2010).

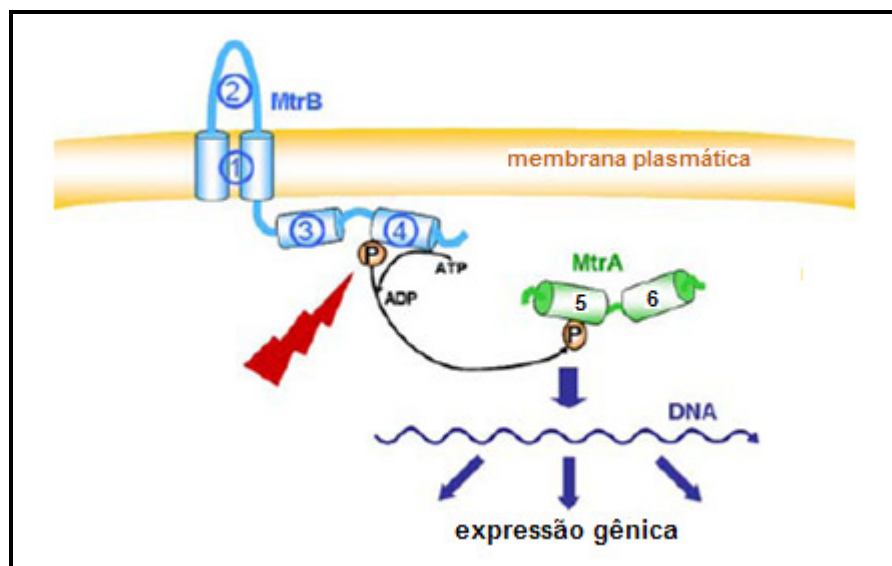


Figura 4.25: Representação esquemática da transdução de sinais pelo sistema MtrAB durante a resposta de *C. glutamicum* ao estresse hiperosmótico. O domínio de entrada (1 e 2) da histidina quinase MtrB é estimulado (seta vermelha). O sinal proveniente do estímulo é, então, transduzido pelo domínio transmissor (3 e 4), o qual tem um resíduo de histidina conservado autofosforilado. Depois, esse grupo fosfato é transferido para um resíduo de aspartato do domínio destinatário (5) do regulador solúvel MtrA, o que modifica a conformação do domínio de saída (6) dessa proteína. Este, por sua vez, se liga ao DNA, levando a uma mudança nos padrões de expressão gênica (ativação ou inibição da transcrição de certos grupos de genes). **TRADUZIDO E ADAPTADO:** Krämer, 2009; 2010.

Desse modo, com o propósito de se testar a hipótese da expressão do fator sigma alternativo σ^H ser uma das estratégias utilizadas por *C. pseudotuberculosis* quando ela se depara com um ambiente no qual ela é submetida ao estresse hiperosmótico, talvez contribuindo para a regulação da transcrição dos genes que codificam para as proteínas que compõem os sistemas de absorção de solutos compatíveis e/ou os sistemas de transdução de sinais de dois componentes, como o sistema MtrAB, as linhagens tipo-selvagem 1002 e mutante $\Delta sigH$ foram submetidas a esse estresse (NaCl 5M) por um período de 4,5 horas, como descrito anteriormente.

Nos gráficos representados abaixo (Figuras 4.26 e 4.27), pode-se observar que o estresse osmótico (NaCl 5M) afetou significativamente o crescimento tanto da linhagem tipo-selvagem quanto o da linhagem mutante, pois, comparando-se o crescimento percentual de cada uma dessas linhagens quando expostas ao estresse com o crescimento percentual

destas quando cultivadas em condições normais (controles) (Figura 4.27 A e B), é possível perceber que houve uma redução significativa do crescimento de ambas as linhagens para os tempos de 15, 60, 180 e 270 minutos. Além disso, pode-se observar que esse estresse também afetou significativamente a viabilidade de ambas as linhagens uma vez que, comparando-se a viabilidade percentual de cada uma das linhagens em estudo quando expostas ao estresse com a viabilidade percentual destas quando cultivadas em condições normais (controles) (Figura 4.27 C e D), pode-se ver que houve uma redução significativa da viabilidade da linhagem tipo-selvagem para os tempos de 60, 180 e 270 minutos e da linhagem mutante para os tempos de 15, 60, 180 e 270 minutos.

No entanto, assim como para os estresses ácido, térmico e oxidativo, uma vez que o crescimento percentual relativo da linhagem tipo-selvagem foi comparado com o crescimento percentual relativo da linhagem mutante (Figura 4.28 A) quando estas foram expostas ao estresse osmótico, não foi possível observar nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os valores de porcentagem obtidos para cada um dos tempos em que as medições foram feitas. Porém, ao contrário do que ocorreu para os estresses previamente discutidos, uma vez que a viabilidade percentual relativa da linhagem tipo-selvagem foi comparada com a viabilidade percentual relativa da linhagem mutante (Figura 4.28 B) quando estas foram expostas ao estresse osmótico, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre os valores de porcentagem obtidos para o tempo de 15 minutos, no qual a linhagem *ΔsigH* apresentou uma viabilidade um pouco menor do que a linhagem 1002 selvagem. Para os outros tempos em que as medições foram feitas (60, 180 e 270 minutos), entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de porcentagem obtidos.

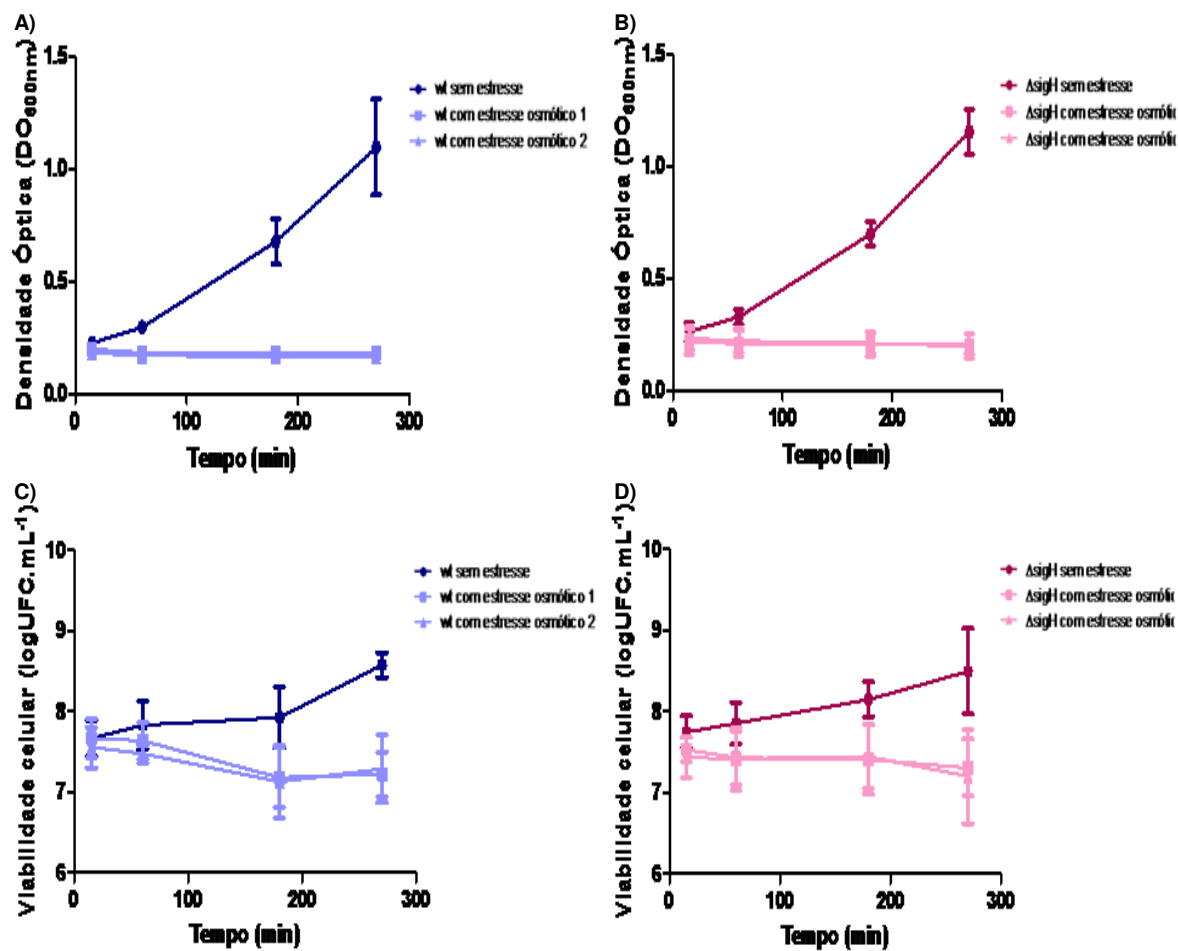


Figura 4.26: Curvas de crescimento e viabilidade das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H (Δ sigH) quando foram expostas ao agente causador do estresse osmótico (NaCl 5M) em duplicata e quando crescidas em condições normais (sem estresse). (A e C) Linhagem tipo-selvagem 1002. (B e D) Linhagem mutante para o fator sigma H. As curvas representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

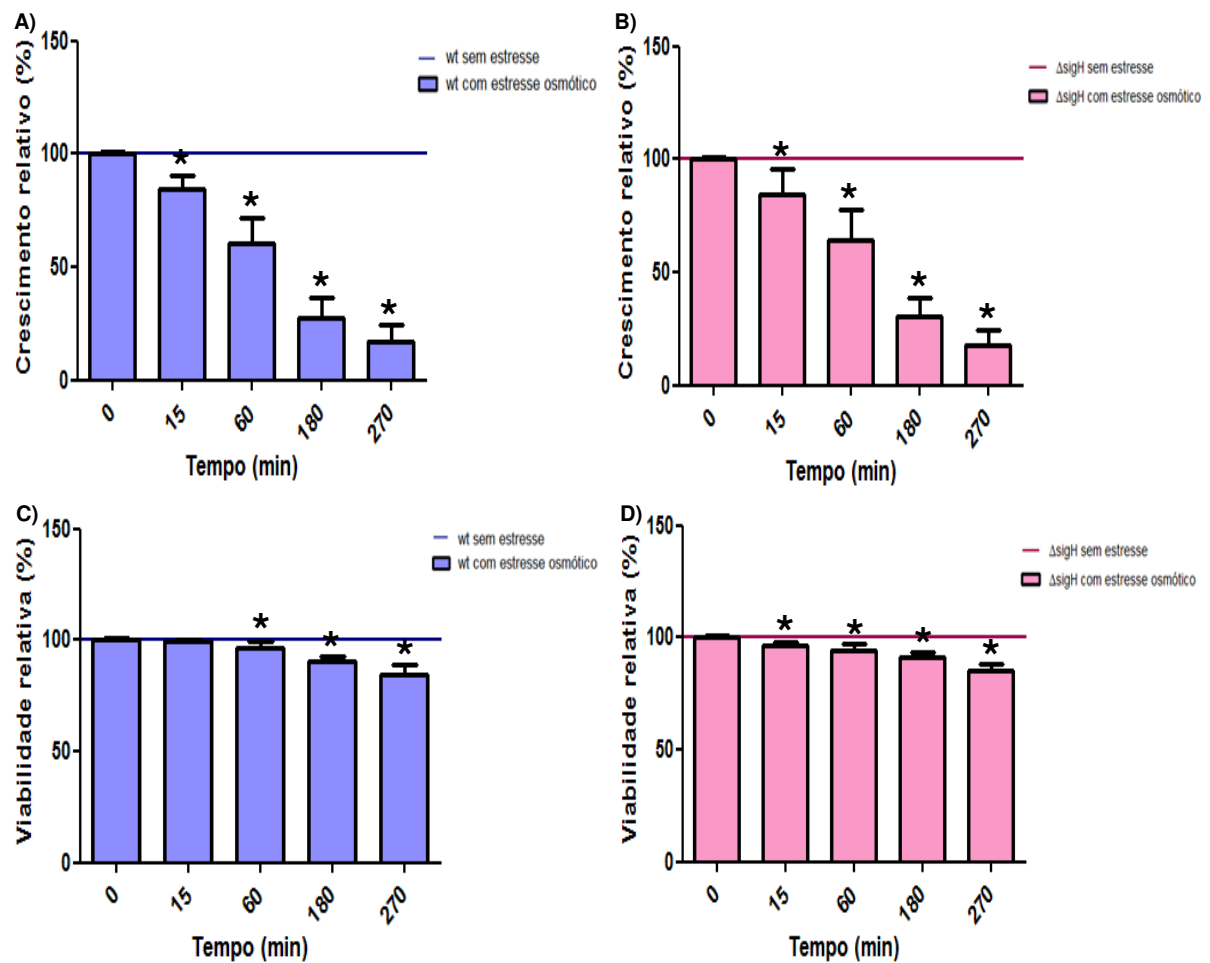


Figura 4.27: Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator σ^H (ΔsigH) quando expostas ao agente causador do estresse osmótico (NaCl 5M) com o crescimento e a viabilidade percentuais das mesmas quando cultivadas em condições normais (sem estresse). (A e C) Linhagem tipo-selvagem 1002. (B e D) Linhagem mutante para o fator sigma H. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student. As barras e as retas representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

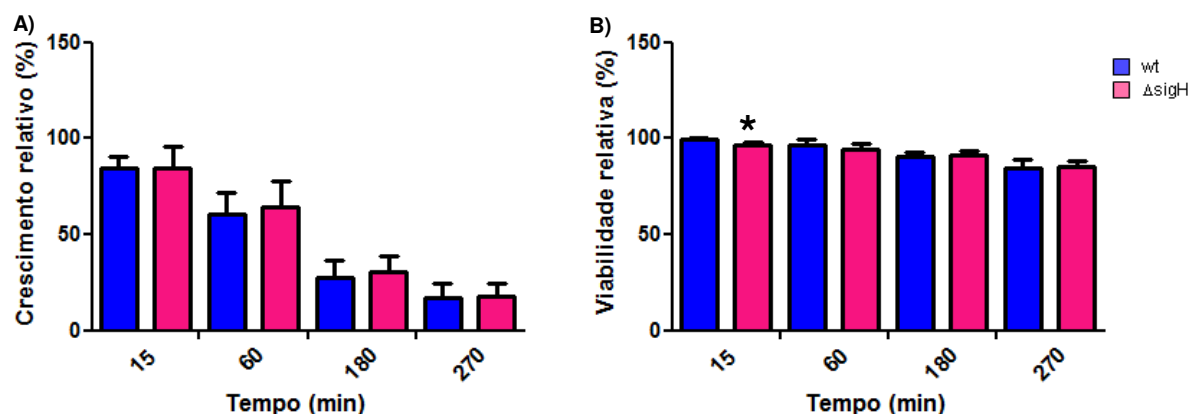


Figura 4.28: Comparação do crescimento e da viabilidade percentuais relativos da linhagem 1002 selvagem (wt) com o crescimento e a viabilidade percentuais relativos da linhagem mutante para o fator σ^H ($\Delta sigH$) de *C. pseudotuberculosis* quando estas foram expostas ao agente causador do estresse osmótico (NaCl 5M). (A) Comparação do crescimento percentual relativo. (B) Comparação da viabilidade percentual relativa. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student. As barras representam os valores médios mais desvios padrão de três experimentos independentes.

Tal resultado, possivelmente, deve-se ao fato de que, aparentemente, o fator sigma alternativo σ^H de *C. pseudotuberculosis*, não é o responsável direto pela regulação de genes de resposta ao estresse osmótico. Entretanto, há, ainda, a possibilidade desse fator regular a transcrição de outros reguladores que contribuem para a resposta adaptativa de certos microrganismos quando estes são submetidos ao estresse osmótico, como os genes que codificam os fatores sigma alternativos σ^B e σ^M (Hermann, 2002; Manganelli *et al.*, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2005; Pátek & Nervěra, 2010). Isso poderia ser testado, dentre outras técnicas, por meio da comparação da resposta ao estresse hiperosmótico de duplos mutantes como o $\Delta sigB$ - $\Delta sigH$ e o $\Delta sigH$ - $\Delta sigM$ com a resposta dos mutantes $\Delta sigB$, $\Delta sigH$ e $\Delta sigM$ para se verificar a possibilidade de ocorrência de algum tipo de sinergismo. Essa hipótese se torna viável uma vez que tanto o fator σ^B de *C. glutamicum* quanto os fatores σ^B e σ^M de *Bacillus subtilis* – bactéria Gram-positiva modelo, têm o seu papel na resposta ao estresse osmótico experimentalmente comprovado (Hermann, 2002; Manganelli *et al.*, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2005; Pátek & Nervěra, 2010).

Além disso, esses resultados também podem ser devidos ao fato de que a ação do fator σ^H , provavelmente, faz parte do repertório de respostas tardias de *C. pseudotuberculosis* ao estresse osmótico uma vez que, como dito anteriormente, esse tipo de resposta leva de vários minutos a horas para ser ativada e que, por meio dela, as bactérias reagem em nível de transcrição e de tradução por meio da síntese *de novo* de enzimas, sistema de transporte e componentes da parede celular (Krämer, 2009; 2010). Entretanto, não se sabe, ainda,

quais são genes de resposta tardia de *C. pseudotuberculosis* ao estresse osmótico possivelmente regulados por este fator sigma.

4.4.5. Discussão geral

De um modo geral, os resultados obtidos neste estudo se assemelham àqueles obtidos por Pacheco (2010) para o mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* 1002 uma vez que a resposta dessa linhagem mutante também não diferiu, significativamente, da resposta da linhagem tipo-selvagem aos estresses térmico, oxidativo e osmótico. Isso, por sua vez, mostra que, em *C. pseudotuberculosis*, assim como acontece em outros microrganismos como *M. tuberculosis* e *C. glutamicum*, há sim a possibilidade do fator σ^H agir em conjunto com o fator σ^E na regulação de alguns genes, como os de resposta ao choque térmico, os quais atuam na resposta de vários organismos não somente ao estresse térmico (altas temperaturas), mas também a outros estresses, como o estresse oxidativo.

No entanto, os resultados aqui obtidos diferiram daqueles obtidos por Domingueti (2011) para o mutante $\Delta sigC$ de *C. pseudotuberculosis* 1002 já que, além do estresse ácido não ter afetado nenhuma das duas linhagens utilizadas, a resposta da linhagem mutante diferiu significativamente da resposta da linhagem selvagem aos estresses térmico, oxidativo e osmótico. Isso contribui, então, para a hipótese de que, em *C. pseudotuberculosis*, assim como para outras bactérias como *M. tuberculosis*, o fator σ^H e o fator σ^C possuem regulomas independentes. Porém, há, ainda, a possibilidade desses fatores agirem em fases diferentes do crescimento bacteriano e/ou serem ativados por estímulos diferentes.

Além disso, esses resultados diferiram, também, de inúmeros estudos feitos por diferentes grupos de pesquisa para outras bactérias, como *M. tuberculosis* e *C. glutamicum*, ambas as espécies filogeneticamente próximas de *C. pseudotuberculosis*, nos quais foi demonstrada a ação do fator σ^H nas respostas desses organismos aos estresses térmico e oxidativo (Raman *et al.*, 2001; Manganelli *et al.*, 2002; Bashyam & Hasnain, 2004; Manganelli *et al.*, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2005; Rodrigue *et al.*, 2006; Ehira *et al.*, 2009; Sachdeva *et al.*, 2009; Pátek & Nešvera, 2010).

Todavia, ainda assim acredita-se que o fator σ^H de *C. pseudotuberculosis*, como o de outras bactérias filogeneticamente próximas, age na resposta dessa bactéria a alguns dos estresses testados, principalmente os estresses térmico e oxidativo, o que, em parte, pode ser corroborado pelos resultados obtidos por Castro (2009), os quais demonstram que o

gene *sigH* tem a sua transcrição aumentada quando *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem é submetida a diferentes agentes causadores do estresse oxidativo. Ademais, Castro (2009) também sugere, por meio da observação dos resultados obtidos por ele, que a resistência de *C. pseudotuberculosis* ao estresse oxidativo, provavelmente, envolve uma cascata de ativação de fatores sigma, a qual iniciaria pela ativação do fator σ^H e seguiria com a ativação dos fatores σ^M e σ^B .

Desse modo, devido aos fatos apresentados, aos resultados aqui obtidos e às hipóteses propostas, é sugerido que estudos complementares sobre o fator sigma alternativo σ^H de *C. pseudotuberculosis* sejam feitos uma vez que, aparentemente, esse fator parece ser uma peça central da regulação gênica em resposta a alguns tipos de estresses ambientais, podendo ser, assim, crucial para a sobrevivência dessa bactéria em seu habitat.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho tem como conclusões que:

- Por meio de eventos de recombinação homóloga simples entre um fragmento do gene de interesse clonado num vetor não replicativo na espécie bacteriana em questão e o gene de interesse presente no cromossomo bacteriano, foi possível gerar a linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis*.
- A partir da execução dos experimentos em que foi avaliada a resistência da linhagem mutante $\Delta sigH$ em comparação com a resistência da linhagem tipo-selvagem de *C. pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse *in vitro*, foi possível observar que:
 - i. As linhagens tipo-selvagem e mutante foram igualmente afetadas pelos estresses ácido, térmico e osmótico;
 - ii. O crescimento das linhagens tipo-selvagem e mutante foi igualmente afetado pelo estresse osmótico;
 - iii. A viabilidade da linhagem mutante foi um pouco mais afetada pelo estresse osmótico do que a da linhagem tipo-selvagem.

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre perspectivas para:

- Realizar, tanto na linhagem tipo-selvagem quanto na linhagem mutante $\Delta sigH$, ensaios de expressão diferencial de alguns genes que podem ser considerados candidatos a comporem o reguloma do fator σ^H de *C. pseudotuberculosis* quando cultivada em condições normais e quando submetida aos estresses ácido, térmico, oxidativo e osmótico;
- Comparar os níveis de expressão diferencial dos genes candidatos a comporem o reguloma do fator σ^H de *C. pseudotuberculosis* da linhagem tipo-selvagem com os da linhagem mutante $\Delta sigH$ quando cultivadas em condições normais e quando submetidas aos estresses ácido, térmico, oxidativo e osmótico;
- Caracterizar o transcriptoma da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* quando cultivada em condições normais e quando submetida aos estresses ácido, térmico, oxidativo e osmótico;
- Comparar o transcriptoma da linhagem tipo-selvagem com o da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* quando cultivadas em condições normais e quando submetidas aos estresses ácido, térmico, oxidativo e osmótico;
- Caracterizar o proteoma da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* quando cultivada em condições normais e quando submetida aos estresses ácido, térmico, oxidativo e osmótico;
- Comparar o proteoma da linhagem tipo-selvagem com o da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* quando cultivadas em condições normais e quando submetidas aos estresses ácido, térmico, oxidativo e osmótico;
- Avaliar a persistência da infecção e da virulência da linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* tanto em macrófagos quanto em camundongos;
- Caso apresente um fenótipo atenuado, testar a linhagem mutante $\Delta sigH$ de *C. pseudotuberculosis* como uma possível vacina contra a linfadenite caseosa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIELLO, S.; MAYS, A.; MERCK & CO. The Merck Veterinary Manual. 8.ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck & Co, in cooperation with Merial Limited, p. 55-56, 1998.

ALVES, F.S.F. & PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas. Sociedade Nacional de Agricultura, ano 100, 1997.

ARSENAULT, J.O.; GIRARD, C. ; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D. O.; GALARNEAU, J.-R.; BOISCLAIR, J., SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. Prev. Vet. Med., 59: 67-81, 2003.

BAIRD G.J. & FONTAINE M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. J. Comp. Path., 137:179-210, 2007.

BASHYAM, M.D. & HASNAIN, S.E. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. Infect. Genet. Evol., 4: 301-308, 2004.

BILLINGTON S.J.; ESMAY, P.A.; SONGER, J.G.; JOST, B.H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett., 208: 41-45, 2002.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bactéria and protein damage by reactive oxygen species. Internati. Microbiol., 3: 3-8, 2000.

CAMPBELL, E.A.; WESTBLADE, L.F.; DARST, S.A. Regulation of bacterial RNA polymerase σ factor activity: a structural perspective. Curr. Opin. Microbiol., 11 (2): 121-127, 2008.

CASTRO, T.L.P. Avaliação da expressão diferencial de genes codificadores de fatores sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a agentes geradores de estresse oxidativo. (Dissertação de Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

CHOI, S.H.; BAUMLER, D.J.; KASPAR, C.W. Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol., 66 (9): 3911-3916, 2000.

COLLETT, M.G.; BATH, G.F.; CAMERON, C.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: COLLETT, M.G.; BATH, G.F.; CAMERON, C.M. Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa. Oxford University Press, 1994. p. 1387-1395.

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67 (3): 429-453, 2003.

COYLE, M.B. e LIPSKY, B.A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. Clin. Microbiol. Rev., 3: 227-246, 1990.

DOMINGUETI, C.P. Análise do papel do fator sigma C na resposta de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse ambiental. (Dissertação de Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet. Res., 37:201-218, 2006a.

DORELLA, F.A.; ESTEVAM, E.M.; PACHECO, L.G.C.; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.P.; GOMES, E.A.; BARSANTE, M.M.; OLIVIERA, S.C.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *In vivo* insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. Appl. Environ. Microbiol., 72:7368-7372, 2006b.

DORELLA, F.A.; ESTEVAM, E.M.; CARDOSO, P.G.; SAVASSI, B.M.; OLIVEIRA, S.C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A. An improved protocol for eletrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet. Microbiol., 114: 298-303, 2006c.

EHIRA, S.; TERAMOTO, H.; INUI, M.; YUKAWA, H. Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. J. Bacteriol., 191 (9): 2964-2972, 2009.

FARIA, G.A., MORAIS, O.R., GUIMARÃES, P.H.S. Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. Relatório técnico [online]. <www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovinoaprinocultura.pdf>. 2004

GASKELL, A.A.; CRACK, J.C.; KELEMEN, G.H.; HUTCHINGS, M.I.; BRUN, N.E.L. RsmA is an anti-sigma factor that modulates its activity through a [2Fe-2S] cluster cofactor. Journal of Biological Chemistry, 282 (43): 31812-31820, 2007.

GEIDUSCHEK, E.P.; KASSAVETIS, G.A. Transcription of the T4 late genes. Virol. J., 7: 288, 2010.

GUIMARÃES, A.S.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R.W.D., MEYER, R.; CARMO, F.B., CRUZ, J.C., LAGE, A.P., HEINEMANN, M.B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A.M.G. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys, S. Rum. Res., 87: 86-91, 2009.

HALGASOVA, N.; BUKOVSKA, G.; UGORCAKOVA, J.; TIMKO, J.; KORMANEC, J. The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. FEMS Microbiol. Lett., 216: 77-84, 2002.

HASSETT, D.J.; COHEN, M.S. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. The FASEB Journal, 3: 2574-2582, 1989.

HELMANN, J.D. Anti-sigma factors. Curr. Opin. Microbiol., 2: 135-141, 1999.

HELMANN, J.D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. Adv. Microb. Physiol. 46: 47-110, 2002.

HODGSON, A.L.; BIRD, P.; NISBET, I.T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. J. Bacteriol., 172: 1256-1261, 1990.

HODGSON, A.L.M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; RADFORD, A.J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.*, 60: 2900–2905, 1992.

HODGSON, A.L.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; McCOLL, M.; CAMERON, A. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, 17: 802–808, 1999.

JURTSHUK, P.J. Bacterial metabolism. In: Baron, S. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7919/>>.

KAZMIERCZAK, M.J., WIEDMANN, M., BOOR, K.J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 527-543, 2005.

KRÄMER, R. Osmosensing and osmosignaling in *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids*, 37: 487-497, 2009.

KRÄMER, R. Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. *The Chemical Record*, 10: 217-229, 2010.

KURIA, J.K.N.; MBUTHIA, P.G.; KANG'ETHE, E.K.; WAHOME, R.G. Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. *Veterinary Research Communications*, 25: 89-97, 2001.

LARISCH, C.; NAKUNST, D.; HÜSER, A.T.; TAUCH, A.; KALINOWSKI, J. The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase. *BMC Gen.*, 8: 4, 2007.

LIU, D.T.; CHAN, W.M.; FAN, D.S.; LAM, D.S. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Br. J. Ophthalmol.*, 89: 245–246, 2005.

LUSHECHAK, V.I. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry*, 66(5): 476-489, 2001.

MANGANELLI, R.; VOSKUIL, M.I.; SCHOOLNIK, G.K.; DUBNAU, E.; GOMEZ, M.; SMITH, I. Role of the extracytoplasmic-function σ factor σ^H in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Molecular Biology*, 45 (2): 365-374, 2002.

MANGANELLI, R.; PROVEDDI, R.; RODRIGUE, S.; BEAUCHER, J.; GAUDREAU, L.; SMITH, I. σ factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 186 (4): 895-902, 2004.

McKEAN, S.; DAVIES, J.K.; MOORE, R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microb. Infect.*, 7: 1352-1363, 2005.

McKEAN, S.C., DAVIES, J.K., MOORE, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology* 153: 2203-2211, 2007a.

McKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 degrees. C. Res. Microbiol., 158: 279-286, 2007b.

McNAMARA, P.J.; CUEVAS, W.A.; SONGER, J.G. Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. Gene, 156: 113-118, 1995.

MIYOSHI, A., POQUET, I., AZEVEDO, V., COMMISSAIRE, J., BERMUDEZ-HUMARAN, L., DOMAKOVA, E., LE LOIR, Y., OLIVEIRA, S.C., GRUSS, A., LANGELLA, P. Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3141-3146, 2002.

OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W.; BURET, A.G.; READ, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can. J. Vet. Res., 66: 86-92, 2002.

PACHECO, L.G.C. Caracterização do exoproteoma basal e variante de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a relação com a virulência reduzida de uma linhagem mutante para um fator sigma alternativo. 2010. (Tese doutorado em bioquímica e imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

PACHECO, L.G.C.; PENA, R.R.; CASTRO, T.L.P.; DORELLA, F.A.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; FROTA, M.N.L.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; ALVES, F.S.F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR Assay for Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Pure Cultures and for Rapid Detection of this Pathogen in Clinical Samples. J. Med. Microbiol., 56: 480-486, 2007.

PARK, S.; YOUN, J.; KIM, Y.; LEE, S.; KIM, Y.; LEE, H. *Corynebacterium glutamicum* sigma E is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti-sigma factor CseE. Microbiology, 154: 915-923, 2008.

PÁTEK, M.; NEŠVERA, J. Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. J. Biotechnol., doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.01.017, 2010.

PATON, M.W.; ROSE, I.R. HART, R.A.; SUTHERLAND, S.S.; MERCY, A.R., ELLIS, T.M.; DHALIWAL, J.A. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production. Aust. Vet. J., 71: 47-49, 1994.

PIONTKOWSKI, M.D.; SHIVVERS, D.W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. J. Am. Vet. Med. Assoc., 212: 1765-1768, 1998.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Doenças causadas por bactérias. In: RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 653-655, 2002.

RAMAN, S.; SONG, T.; PUYANG, X.; BARDAROV, S.; JACOBS JR., W.R.; HUSSON, R.N. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol., 183 (20): 6119-6125, 2001.

RIBEIRO, M.G.; JÚNIOR, J.G.D.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.G.; JÚNIOR, G.N.; LISTONI, F.J.P. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. Arq. Inst. Biol., 68: 23-28, 2001.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The heat shock response: life on the verge of death. Molecular Cell, DOI 10.1016/j.molcel.2010.10.006, 2010.

RODRIGUE, S.; PROWED, R.; JACQUES, P.; GAUDREAU, L.; MANGANELLI, R. The σ factors of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol. Rev, 30: 926-941, 2006.

ROHDE, K.; YATES, R.M.; PURDY, G.E.; RUSSELL, D.G. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. Immunol. Rev., 219: 37-54, 2007.

SACHDEVA, P.; MISRA, R.; TYAGI, A.K.; SINGH, Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. FEBS Journal, 277: 605-626, 2009.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463-5467, 1977.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G.C.; PORTELA, R.W.; BASTOS, B.L.; DORELLA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; GOUVEIA, A.M.G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res. Vet. Sci. 88: 50-55, 2010.

SILVA, A.; SCHNEIDER, M.P.; CERDEIRA, L.; BARBOSA, M.S.; RAMOS, R.T.; CARNEIRO, A.R.; SANTOS, R.; LIMA, M.; D'AFONSECA, V.; ALMEIDA, S.S.; SANTOS, A.R.; SOARES, S.C.; PINTO, A.C.; ALI, A.; DORELLA, F.A.; ROCHA, F.; DE ABREU, V.A.; TROST, E.; TAUCH, A.; SHPIGEL, N.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19, a strain isolated from a cow in Israel with bovine mastitis. J. Bacteriol., 193 (1): 323-324, 2011.

SMIBERT, R.M.; KRIEG, N.R. Phenotypic characterization, p. 607-654. In Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR (ed.), Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

TASHJIAN, J.J.; CAMPBELL, S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. Am. J. Vet. Res., 44: 690-693, 1983.

WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract., 17: 359-371, 2001.

8. ANEXOS

Bianca Mendes Souza
Curriculum Vitae

Junho/2011

Bianca Mendes Souza

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Bianca Mendes Souza

Nome em citações bibliográficas SOUZA, Bianca Mendes; SOUZA, B.M.

Sexo feminino

Filiação Edivar Caetano de Souza e Maria José Mendes Caetano de Souza

Nascimento 10/08/1984 - Belo Horizonte/MG - Brasil

Carteira de Identidade MG10033997 SSP - MG - 15/01/2004

CPF 06757388650

Endereço residencial Rua Cambé, nº 861
Coqueiros - Belo Horizonte
30880-440, MG - Brasil
Telefone: 31 30823721
URL da home page: <http://>

Endereço profissional Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências
Biológicas
Avenida Antônio Carlos, nº 6627
Pampulha - Belo Horizonte
31270-901, MG - Brasil
Telefone: 31 34092873

Endereço eletrônico

e-mail para contato : pinktakai@yahoo.com.br

e-mail alternativo : biankams84@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2010** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: CONSTRUÇÃO DE UM MUTANTE DEFICIENTE PARA O GENE sigH CODIFICADOR DO FATOR SIGMA ALTERNATIVO sigH E ANÁLISE DO PAPEL DESSE FATOR NA RESPOSTA DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE AMBIENTAL
Orientador: Anderson Miyoshi
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Palavras-chave: Corynebacterium pseudotuberculosis, linhagem mutante, sigma H, estresse ambiental
Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos
- 2004 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: Portifólio Referente ao Estágio no Colégio Neusa Rocha
Orientador: Monica Angela de Azevedo Meyer

Formação complementar

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Introdução ao Programa Bionumerics.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Genética na Conservação.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
Palavras-chave: Conservação, Ecologia, Genética
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Tópicos na Manutenção de Animais Selvagens Ex-Situ.
Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilheus, Brasil
Palavras-chave: Ecologia, Conservação, Manejo, Animais Selvagens, Animais Ex-Situ

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Vínculo institucional

- 2010 - Atual** Vínculo: Mestrado em Genética, Enquadramento funcional: Mestranda, Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva
Outras informações:
* Mestrado realizado no Laboratório de Genética Celular e Molecular do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a orientação do Prof. Dr. Anderson Miyoshi e co-orientação do Prof. Dr. Vasco Azevedo. * Bolsa de mestrado FAPEMIG
- 2007 - 2008** Vínculo: Livre, Enquadramento funcional: Estagiário de Iniciação Científica Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
* Estágio realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a orientação de Adlane Vilas Boas Ferreira. * Bolsa PROBIC/FAPEMIG
- 2006 - 2007** Vínculo: Livre, Enquadramento funcional: Estagiário de Iniciação Científica Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
* Estágio realizado no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a orientação de Luiz de Macêdo Farias. * Bolsa PROBIC/FAPEMIG
- 2005 - 2006** Vínculo: Livre, Enquadramento funcional: Estagiário de Iniciação Científica Voluntário, Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
* Estágio realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a orientação de Adlane Vilas Boas Ferreira.
- 2005 - 2005** Vínculo: Livre, Enquadramento funcional: Estagiário de Iniciação Científica Voluntário, Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
* Estágio realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a orientação de Maria de Fátima Martins Horta.

Atividades

- 03/2010 - Atual** Projetos de pesquisa, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral
Participação em projetos:
*CONSTRUÇÃO DE UM MUTANTE DEFICIENTE PARA O GENE *sigH* CODIFICADOR DO FATOR SIGMA ALTERNATIVO *sigH* E ANÁLISE DO PAPEL DESSE FATOR NA RESPOSTA DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE AMBIENTAL*

02/2007 - 08/2008 Estágio, Instituto de Ciências Biológicas

Estágio:

Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia Geral sob a orientação de Adlane Vilas Boas Ferreira

02/2006 - 02/2007 Estágio, Instituto de Ciências Biológicas

Estágio:

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia sob a orientação de Luiz de Macêdo Farias

06/2005 - 02/2006 Estágio, Instituto de Ciências Biológicas

Estágio:

Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia Geral sob a orientação de Adlane Vilas Boas Ferreira

02/2005 - 06/2005 Estágio, Instituto de Ciências Biológicas

Estágio:

Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas do Departamento de Bioquímica e Imunologia sob a orientação de Maria de Fátima Martins Horta

2. Luziana Lanna Idiomas - LLI

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Professor, Regime: Parcial

Atividades

09/2008 - 01/2009 Outro

Especificação:

Língua Inglesa (Básico, Intermediário e Avançado)

Projetos

2010 - 2011 CONSTRUÇÃO DE UM MUTANTE DEFICIENTE PARA O GENE sigH CODIFICADOR DO FATOR SIGMA ALTERNATIVO sigH E ANÁLISE DO PAPEL DESSE FATOR NA RESPOSTA DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE AMBIENTAL

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Integrantes: Bianca Mendes Souza (Responsável); ; Caroline Pereira Domingueti; Luis Gustavo Carvalho Pacheco; Thiago Luiz de Paula Castro; Anderson Miyoshi; Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG

Áreas de atuação

1. Genética Molecular e de Microorganismos
2. Mutagenese

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol	Compreende Pouco , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente
Português	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SOUZA, B.M., DOMINGUETI, C. P., MILITÃO, F., CASTRO, T. L. P., PACHECO, L. G. C., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM MUTANTE PARA O FATOR SIGMA ALTERNATIVO sigH DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA AVALIAR A CONTRIBUIÇÃO DESTE NA RESPOSTA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE E NA VIRULÊNCIA DESSA BACTÉRIA In: VII Fórum de Microbiologia, 2011, Belo Horizonte.

Anais do VII Fórum de Microbiologia. , 2011.

Palavras-chave: Corynebacterium pseudotuberculosis, resposta a estresse, sigma H, virulência

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos, Mutagenese

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. CASTRO, T. L. P., PACHECO, L. G. C., MILITÃO, F., DOMINGUETI, C. P., SOUZA, B.M., SEYFFERT, N., PINTO, A. C., SILVA, W. M., DORELLA, F. A., SILVA, A., MIYOSHI, A., Dowson, C., AZEVEDO, V.

THE INVOLVEMENT OF RNA POLYMERASE SIGMA FACTORS IN THE RESPONSE OF *Corynebacterium pseudotuberculosis* TO IN VITRO OXIDATIVE STRESS In: Spring Conference 2011, 2011, Harrogate.

Abstracts Book of the Spring Conference 2011. , 2011.

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Inglaterra/Inglês. Meio de divulgação: Outro

3. DOMINGUETI, C. P., PACHECO, L. G. C., CASTRO, T. L. P., SOUZA, B.M., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. A. C.

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM MUTANTE PARA O FATOR SIGMA C (SIGC) DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA AVALIAR A CONTRIBUIÇÃO DESTE NA RESPOSTA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE E NA VIRULÊNCIA DESTA BACTÉRIA In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá.

Anais do 56º Congresso Brasileiro de Genética. , 2010.

Palavras-chave: Corynebacterium pseudotuberculosis, linhagem mutante, resposta a estresse, sigma C, virulência

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

4. SOUZA, B.M., SOARES, M. A., MENEZES, D. C., LIMA, G. M., VILAS-BOAS, A.

OBTENÇÃO DE MUTANTES DO FUNGO *Neurospora crassa* RESISTENTES A COMPOSTOS A BASE DE ESTANHO POR MEIO DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA In: XVI Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007, Belo Horizonte.

Anais do XVI Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais. , 2007.

Palavras-chave: Neurospora crassa, compostos de estanho, mutagenese, resistência a drogas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

5. SOUZA, B.M., SOARES, M. A., MENEZES, D. C., LIMA, G. M., VILAS-BOAS, A.
OBTENÇÃO DE MUTANTES DO FUNGO *Neurospora crassa* RESISTENTES A COMPOSTOS A BASE DE ESTANHO POR MEIO DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia.

Anais do 53º Congresso de Genética. , 2007.

Palavras-chave: Neurospora crassa, compostos de estanho, mutagenese, resistência a drogas

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos, Mutagenese

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

6. SANTOS, P. R. Q., ALVAREZ-LEITE, M. E., NUNES, A. C., MOREIRA, J. L. S., FARIA, R. C., SOUZA, B.M., CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L. M.

DIVERSIDAD DEL *Lactobacillus* EN LA CAVIDAD ORAL DE LOS NIÑOS INFECTADOS POR EL HIV In: II Simposio Internacional de Bacterias Lácticas y Primer encuentro Red BAL Argentina, 2006, San Miguel de Tucumán.

Anais do II Simposio Internacional de Bacterias Lácticas y Primer encuentro Red BAL Argentina. , 2006. p.214 - 214

Palavras-chave: Lactobacillus, HIV, Cárie, Crianças

Áreas do conhecimento : Microbiologia Oral e de Anaeróbios

Referências adicionais : Argentina/Espanhol. Meio de divulgação: Impresso

7. SOUZA, B.M., FARIAS, L. M., NUNES, A. C., CARVALHO, M. A. R., FARIA, R. C., SANTOS, P. R. Q., ALVAREZ-LEITE, M. E., MOREIRA, J. L. S.

DIVERSIDADE DE *Lactobacillus* NA CAVIDADE ORAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV In: XV Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006, Belo Horizonte.

Anais do XV Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais. , 2006.

Palavras-chave: Lactobacillus, Microbiota Oral, HIV, Crianças, Cárie

Áreas do conhecimento : Microbiologia Oral e de Anaeróbios

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

Apresentação de Trabalho

1. SOUZA, B.M., DOMINGUETI, C. P., MILITÃO, F., CASTRO, T. L. P., PACHECO, L. G. C., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM MUTANTE PARA O FATOR SIGMA ALTERNATIVO σ^{H} DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA AVALIAR A CONTRIBUIÇÃO DESTA NA RESPOSTA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE E NA VIRULÊNCIA DESSA BACTÉRIA, 2011. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Corynebacterium pseudotuberculosis, resposta a estresse, sigma H, virulência

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos, Mutagenese

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Hipertexto; Local: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; Cidade: Belo Horizonte; Evento: VII Fórum de Microbiologia; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

2. SOUZA, B.M., SOARES, M. A., MENEZES, D. C., LIMA, G. M., VILAS-BOAS, A.

OBTENÇÃO DE MUTANTES DO FUNGO *Neurospora crassa* RESISTENTES A COMPOSTOS A BASE DE ESTANHO POR MEIO DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Neurospora crassa, compostos de estanho, mutagenese, resistência a drogas

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos, Mutagenese

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético; Cidade: Águas de Lindóia; Evento: 53º Congresso Brasileiro de Genética; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Genética

3. SOUZA, Bianca Mendes, SOARES, M. A., MENEZES, D. C., LIMA, G. M., VILAS-BOAS, A.

OBTENÇÃO DE MUTANTES DO FUNGO *Neurospora crassa* RESISTENTES A COMPOSTOS A BASE DE ESTANHO POR MEIO DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Neurospora crassa, compostos de estanho, mutagenese, resistência a drogas

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos, Mutagenese

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Centro de Convenções Monte Real; Cidade: Águas de Lindóia - SP; Evento: 53 Congresso Brasileiro de Genética; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Genética

4. SOUZA, Bianca Mendes, SOARES, M. A., MENEZES, D. C., LIMA, G. M., VILAS-BOAS, A. **OBTENÇÃO DE MUTANTES DO FUNGO *Neurospora crassa* RESISTENTES A COMPOSTOS A BASE DE ESTANHO POR MEIO DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Neurospora crassa, resistência a drogas, mutagenese, compostos de estanho

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos,Mutagenese

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Instituto de Ciências Biológicas; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XVI Semana de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

5. SOUZA, Bianca Mendes, FARIAS, L. M., NUNES, A. C., CARVALHO, M. A. R., FARIA, R. C., SANTOS, P. R. Q., ALVAREZ-LEITE, M. E., MOREIRA, J. L. S. **DIVERSIDADE DE *Lactobacillus* NA CAVIDADE ORAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV**, 2006. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Lactobacillus, Microbiota Oral, HIV, Crianças, Cárie

Áreas do conhecimento : Microbiologia Oral e de Anaeróbios

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Instituto de Ciências Biológicas; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XV Semana de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Minas Gerais

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. SOUZA, B.M.

Relatório de Pesquisa de Iniciação Científica, 2008. (Relatório de pesquisa)

Palavras-chave: Neurospora crassa, compostos de estanho, mutagenese, resistência a drogas

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos,Mutagenese

Referências adicionais : Brasil/Português.

2. SOUZA, B.M.

Relatório de Pesquisa de Iniciação Científica, 2006. (Relatório de pesquisa)

Palavras-chave: Lactobacillus, Microbiota Oral, HIV, Crianças, Cárie

Áreas do conhecimento : Microbiologia Oral e de Anaeróbios

Referências adicionais : Brasil/Português.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Fórum de Microbiologia**, 2011. (Outra)

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM MUTANTE PARA O FATOR SIGMA ALTERNATIVO sigH NA RESPOSTA DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PARA AVALIAR A CONTRIBUIÇÃO DESTA NA RESPOSTA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE E NA VIRULÊNCIA DESSA BACTÉRIA.

2. **1º Simpósio em Modelos Animais - Doenças Inflamatórias**, 2011. (Simpósio)

.

3. **IIX Encontro de Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas e V Encontro Anual de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia**, 2008. (Encontro)

.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVI Semana de Iniciação Científica**, 2007. (Outra)

OBTENÇÃO DE MUTANTES DO FUNGO *Neurospora crassa* RESISTENTES A COMPOSTOS A BASE DE ESTANHO POR MEIO DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **53º Congresso Brasileiro de Genética**, 2007. (Congresso)
OBTENÇÃO DE MUTANTES DO FUNGO *Neurospora crassa* RESISTENTES A COMPOSTOS A BASE DE ESTANHO POR MEIO DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.

6. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XV Semana de Iniciação Científica**, 2006. (Outra)
DIVERSIDADE DE Lactobacillus NA CAVIDADE ORAL DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV.

7. **VII Congresso Internacional Sobre Manejo de Fauna Silvestre na Amazônia e América Latina**, 2006. (Congresso)

.

8. **I Circuito Regional de Biofísica - CiRB**, 2005. (Outra)

.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos.....	7
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	2
Apresentações de Trabalhos (Outra).....	3

Produção Técnica

Relatório de pesquisa.....	2
----------------------------	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	2
Participações em eventos (simpósio).....	1
Participações em eventos (encontro).....	1
Participações em eventos (outra).....	4

Outras informações relevantes

1 Possui o Certificate of Advanced English (CAE) - University of Cambridge ESOL Examinations

2 Possui certificado que comprova experiência didática por ter ministrado parte da carga horária da disciplina "Introdução a Genética e Evolução " para uma turma de Terapia Ocupacional da UFMG como sendo requisito para a aprovação na disciplina "Experiência Didática I (BIG869)