

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



Dissertação de Mestrado

Avaliação da regulação transcricional do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta aos estresses nitrosativo e ácido

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Azevedo**

CO-ORIENTADOR: **Dra. Fernanda Dorella**

BELO HORIZONTE

2012

Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

**Avaliação da regulação transcricional do
fator sigma E de *Corynebacterium
pseudotuberculosis* em resposta aos
estresses nitrosativo e ácido**

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. Vasco Azevedo

Co-orientador: Dra. Fernanda Dorella

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFMG

2012

Carvalho, Rodrigo Dias de Oliveira.

Avaliação da regulação transcricional do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta aos estresses nitrosativo e ácido. [manuscrito] / Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho. – 2012.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Vasco Azevedo. Co-orientadora: Fernanda Dorella.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* - Teses. 2. Expressão gênica 3. Genética - Teses. 4. Fator sigma. 5. Linfadenite caseosa - Teses. Resposta ao estresse. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Dorella, Fernanda Alves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



**"Avaliação da regulação transcricional do fator sigma E de
Corynebacterium pseudotuberculosis em resposta aos estresses
nitrosativo e ácido"**


Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador
UFMG


Fernanda Alves Dorella - Co-Orientador
UFMG


Jose Miguel Ortega
UFMG


Patricia Silva Cisalpino
UFMG

Belo Horizonte, 30 de julho de 2012.

AGRADECIMENTOS

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

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES;

Ao meu orientador prof. Dr. Vasco Azevedo pela oportunidade e pela confiança depositada em mim;

À minha co-orientadora Dra. Fernanda Dorella pelos conselhos e correções.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem este trabalho;

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

À minha família e aos meus amigos pelo apoio e torcida por meu sucesso e felicidade;

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é um patógeno intracelular de grande relevância veterinária que infecta pequenos ruminantes, causando uma enfermidade conhecida como Linfadenite Caseosa (LC). Esta doença é distribuída mundialmente e está associada a grandes perdas econômicas. Apesar do processo patológico da LC ser bem entendido, existem poucos estudos sobre os determinantes moleculares de virulência de *C. pseudotuberculosis*. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo das proteínas moduladoras da expressão gênica, tais como os fatores sigmas da RNA polimerase bacteriana. A regulação da expressão gênica realizada por fatores sigma alternativos é crucial para a sobrevivência bacteriana em condições ambientais hostis, como a encontrada no ambiente intrafagossômico durante a infecção. O fator sigma σ^E é o regulador transcricional mais estudado de *C. pseudotuberculosis*, tendo sido demonstrado seu envolvimento na resposta adaptativa deste microrganismo ao estresse nitrosativo. Entretanto, ainda não tinha sido realizado um estudo aprofundado acerca da regulação da expressão do gene *sigE*, que codifica este fator. Neste trabalho foi realizada a caracterização *in silico* da estrutura da unidade transcricional deste gene e ensaios de RT-PCR na tentativa de confirmar se o gene *sigE* da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* estaria organizado em *operon* juntamente com os genes *cseE* e *tatB*, genes que codificam respectivamente um possível regulador negativo do fator sigma E e um componente de um sistema de secreção alternativo, *Twin Arginine Translocase*. Além disso, os níveis de transcrição dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* foram avaliados pela técnica de RT-qPCR em culturas expostas aos estresses nitrosativo e ácido induzidos *in vitro* a fim de se confirmar envolvimento destes genes na resposta adaptativa específica a estes estresses. Os resultados obtidos confirmaram que os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* constituem um *operon* que os genes *sigE* e *cseE* são ativados na resposta de *C. pseudotuberculosis* 1002 aos estresses nitrosativo e ácido enquanto que o gene *tatB* é ativado somente na resposta ao estresse nitrosativo. Tomados juntos, esses dados sugerem que os genes deste *operon* possam ser regulados diferencialmente, por um mecanismo complexo a nível transcricional, dependendo do estímulo do ambiente.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is an intracellular pathogenic bacteria of great veterinary importance that infects small ruminants, causing a disease known as Caseous Lymphadenitis. This disease is distributed worldwide and has been associated with economic losses. Although the pathogenesis of this disease is well understood, there are few studies on the molecular determinants of pathogenicity of this microorganism. In this context, it's required new studies on the biological mechanisms involved during the course of infection, mainly because there are no satisfactory treatment and vaccines to fight the disease yet. In order to understand the role of the determinants of pathogenicity and how they are regulated during the process of infection, our research group has focused in proteins that modulate gene expression such as sigma factors of bacterial RNA polymerase. The regulation of gene expression by alternative sigma factors is crucial for adaptation and survival of intracellular pathogens by promoting the transient activation of specific genes involved in response to hostile conditions encountered in intrafagossomic environment, generated by the host immune system. In *C. pseudotuberculosis*, σ^E is the most well studied alternative sigma factor and it has been demonstrated its role in the adaptive response of this microorganism. However, it has not been carried out a detailed study on the regulation of expression of the *sigE* gene, which encodes sigma factor E. This work was done a characterization of the structure of the transcriptional unit of this gene using bioinformatics algorithms and by RT-PCR method in an attempt to confirm whether the gene *sigE* of *C. pseudotuberculosis* 1002 would be arranged in an *operon* in conjunction with the genes *cseE* and *tatB*, which encode, respectively, a possible negative regulator of sigma factor E and a component of an alternative secretion system, the Twin Arginine Translocase System. Moreover, the level of transcription of the genes *sigE*, *tatB* and *cseE* were evaluated by RT-qPCR essays in cultures exposed to nitrosative and acid stresses in order to confirm their involvement in adaptive response to environmental stress. The results of this study confirmed that the genes *sigE*, *cseE* and *tatB* constitute an *operon* in this species and that the genes *sigE* and *cseE* are activated in response to nitrosative and acidic stress while *tatB* is only activated in response to nitrosative stress. Taken together, these data suggests that the *operon* genes could be differentially regulated, by a complex transcriptional mechanism, when the bacteria is exposed to different environmental stimuli.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da holoenzima RNA polimerase no sítio inicial de transcrição.....	19
Figura 2. Domínios conservados dos 4 grupos de fatores sigmas da família σ^{70}	21
Figura 3. Visualização da disposição dos genes <i>sigE</i> , <i>cseE</i> e <i>tatB</i> na fita direta do genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 pelo software Artemis.....	28
Figura 4. Representação dos sítios de anelamento dos iniciadores, utilizados nas reações de RT-PCR, nas ORF's no loci gênico de <i>sigE</i> , <i>cseE</i> e <i>tatB</i>	42
Figura 5. Curva padrão de uma reação de qPCR representando uma eficiência de amplificação de 100%.....	46
Figura 6. Representação esquemática da normalização do nível de expressão do gene alvo pela utilização de um gene normalizador através do método $\Delta\Delta Ct$	48
Figura 7. Visualização da predição realizada pela ferramenta DOOR v2.0.....	51
Figura 8. Predição de promotores pelas ferramentas BROM e NNPP.....	54
Figura 9. Predições de sítio de terminação rho-independentes.....	55
Figura 10. Exemplo de visualização de sítio de terminação predito pela ferramenta WebGeSTer.....	55
Figura 11. Efeito do estresse nitrosativo sobre o crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002.....	57
Figura 12. Efeito do estresse ácido sobre o crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002.....	58
Figura 13. Resolução em gel de agarose 1% dos produtos amplificados através de RT-PCR.....	61
Figura 14. Regressão linear dos valores de Ct referente ao gene <i>sigE</i>	62
Figura 15. Regressão linear dos valores de Ct referente aos genes <i>cseE</i> e <i>tatB</i>	63
Figura 16. Curvas de dissociação contínua obtidas para os transcritos relativos ao gene <i>sigE</i>	64
Figura 17. Ausência de amplificação por qPCR dos produtos de RNA extraídos de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002.....	65
Figura 18. Representação gráfica do nível de expressão dos genes <i>sigE</i> , <i>cseE</i> e <i>tatB</i> na condição estresse nitrosativo em relação ao controle.....	67

Figura 19. Representação gráfica do nível de expressão dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* na condição de estresse ácido em relação ao controle.....**69**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meio quimicamente definido para cultivo de <i>C. pseudotuberculosis</i>	37
Tabela 2. Quantidades de DETA/NO empregadas neste trabalho.....	38
Tabela 3. Combinações de primers utilizados no ensaio de RT-PCR e o tamanho do <i>amplicon</i> esperado.....	41
Tabela 4. Reagentes e suas quantidades utilizadas nas reações de qPCR.....	43
Tabela 5. Parâmetros selecionados no termociclador para o processamento das reações de qPCR.....	44
Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.....	45
Tabela 7. Predição de operons para os gene <i>sigE</i> , <i>cseE</i> e <i>tatB</i> das espécies do grupo CMNR com sequências depositadas na base de dados do DOOR v2.0.....	52
Tabela 8. Concentração de RNA total das amostras e quantidades empregadas nas reações de transcrição reversa.....	60
Tabela 9. Valores de ΔC_t calculados para a normalização dos C_t s obtidos para as ampliações por qPCR, relativos ao estresse induzido pelo DETA/NO.....	66
Tabela 10. Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculados para cada gene após a exposição a 100 uM de DETA/NO.....	67
Tabela 11. Valores de ΔC_t calculados para a normalização dos C_t s obtidos para as ampliações por qPCR, relativos ao estresse induzido pela acidez.....	68
Tabela 12. Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculados para cada gene após a exposição ao estresse ácido (pH 5.5).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP** – Trifosfato de adenosina
- ASC** – Área sob a curva
- BCG** – Bacilo Calmette-Guérin
- BHI** – Infusão cérebro-coração, do inglês *Brain - Heart Infusion*
- cDNA** – DNA complementar
- Ct** – Ciclo limiar, do inglês *Cycle threshold*
- CMNR** – *Corynebacterium - Mycobacterium – Nocardia - Rhodococcus*
- DETA/NO** – NONOato de dietilenotriamina
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico
- DO** – Densidade ótica
- ECF** – Função extracitoplasmática, do inglês *Extracitoplasmatic Funcion*
- gDNA** – DNA genômico
- GI** – Identificador de informação genética, do inglês *GenInfo Identifier*
- G+C** – Guanina + Citosina
- h** – Hora
- IC** – Índice de crescimento
- ID** – Identidade de documento
- iNOS** – Óxido nítrico sintase indutível
- kb** - Quilobase
- kDa** - Quilodalton
- LC** – Linfadenite Caseosa
- M** - Molar
- min** - Minuto
- mL** - Mililitro
- mm** - Milímetro
- mM** - Milimolar
- MQD** – Meio Quimicamente Definido
- ng** - Nanograma
- nm** – Nanômetro
- NO** – Óxido nítrico
- NTC** – Controle sem fita molde, do inglês *No Template Control*
- ORF**- Janela aberta de leitura, do inglês *Open Reading Frame*
- pb** – Pares de base
- °C** – Graus Celsius
- PCR** – Reação em cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

rDNA - DNA codificador do RNA ribossômico

RNA – Ácido ribonucleico

RNAP – RNA polimerase

RNA seq – Sequenciamento de RNA

rpm – Rotações por minuto

RT – Transcrição reversa, do inglês *Reverse Transcriptase*

RT-PCR – PCR de transcrição reversa, do inglês *Reverse Transcriptase PCR*

RT-qPCR – RT-PCR quantitativo, do inglês *RT quantitative PCR*

s - Segundo

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TAT – Translocase de argininas consecutivas, do inglês *Twin Arginine Translocase*

ufc – Unidade formadora de colônia

µm – Micrometro

µM - Micromolar

µL – Microlitro

°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	15
1.1.1 Propriedades microbiológicas e bioquímicas	15
1.2 Linfadenite Caseosa	16
1.3 Determinantes moleculares de patogenicidade e virulência	17
1.4 Modulação da expressão gênica e adaptação	18
1.5 Fatores Sigmas	19
1.5.1 Classificação dos fatores sigmas	20
1.5.2 Fatores sigmas alternativos	21
1.5.3 Fatores sigmas de função extracitoplasmática	22
1.5.3.1 Envolvimento de fatores sigma ECF na virulência bacteriana	23
1.6 Estudo de fatores sigmas em <i>C. pseudotuberculosis</i>	25
1.6.1 Fator sigma E	27
1.6.1.1 Estrutura da unidade transcricional de <i>sigE</i>	28
1.7 Justificativa	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Equipamentos utilizados	34
3.2 Reagentes utilizados	34
3.3 Kits de biologia molecular	35
3.4 Ferramentas de bioinformática	35
3.5 Linhagem bacteriana e condições de cultivo	36
3.5.1 Condições de estresse <i>in vitro</i>	37
3.5.1.1 Estresse nitrosativo	37
3.5.1.2 Estresse ácido	38
3.6 Avaliação da susceptibilidade de <i>C. pseudotuberculosis</i> aos estresses nitrosativo e ácido	38

3.7 Análises transcricionais.....	39
3.7.1 Amostragem utilizada para a obtenção de RNA total.....	39
3.7.2 Extração de RNA total.....	39
3.7.3 Síntese de cDNA	40
3.7.4 RT- PCR	40
3.7.5 RT-qPCR (PCR quantitativa).....	42
3.7.5.1 Seleção de controle endógeno de normalização para qPCR.....	43
3.7.5.2 Confeção de oligonucleotídeos iniciadores.....	44
3.7.5.3 Determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores.....	45
3.7.5.4 Validação da ausência de DNA genômico.....	46
3.7.5.5 Reações para quantificação relativa e análise de expressão diferencial.....	47
3.7.5.6 Análise da especificidade das reações de qPCR.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1 Identificação e caracterização <i>in silico</i> das unidades transcricionais dos genes <i>sigE</i> , <i>cseE</i> e <i>tatB</i>	51
4.1.1 Predição de <i>operon</i> pela ferramenta <i>DOOR v2.0</i>	51
4.1.2 Indentificação de promotores e sítios de término de transcrição.....	53
4.2 Susceptibilidade de <i>C. pseudotuberculosis</i> aos estresses nitrosativo e ácido.....	56
4.2.1 Efeito causado pela adição de DETA/NO na cultura bacteriana.....	56
4.2.2 Efeito causado pela adição de meio ácido na cultura bacteriana.....	58
4.3 Análises transcricionais.....	60
4.3.1 RNA total obtido e transcrição reversa.....	60
4.3.2 Avaliação da unidade transcricional por RT-PCR.....	61
4.3.3 Reações de PCR quantitativa.....	62

4.3.3.1 Eficiência de amplificação obtidas para os iniciadores.....	62
4.3.3.2 Especificidade das reações de qPCR através de curvas de dissociação.....	64
4.3.3.3 Confirmação da ausência de DNA genômico.....	65
4.3.3.4 Expressão gênica diferencial em resposta ao estresse nitrosativo.....	66
4.3.3.5 Expressão diferencial em resposta ao estresse ácido.....	68
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÃO.....	77
7. PERSPECTIVAS.....	79
8.REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva patogênica de grande relevância veterinária que pertence à família *Actinomycetaceae*, da qual fazem parte também os gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardia* (Baird & Fontaine, 2007). Juntos, estes gêneros constituem o grupo CMNR e possuem características comuns como a presença de alto conteúdo G+C no cromossomo e parede celular composta por peptideoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos (Dorella *et al.*, 2006a).

Algumas espécies do grupo CMNR se destacam pela importância que possuem para aplicações industriais e biotecnológicas, como *Corynebacterium glutamicum* e *Corynebacterium efficiens*, utilizadas na produção de aminoácidos tais como L-aspartato e L-lisina (Koffas & Stephanopoulos, 2005). Em contraste, destacam-se espécies patogênicas como *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium diphtheriae*, que causam respectivamente tuberculose e difteria em seres humanos, e *C. pseudotuberculosis* que infecta diferentes espécies de animais, principalmente pequenos ruminantes (Moore *et al.*, 2010).

1.1.1 Propriedades microbiológicas e bioquímicas

C. pseudotuberculosis é uma bactéria gram-positiva, intracelular facultativa, não esporulante, imóvel e possui fímbrias. Apresenta formas pleomórficas que variam desde cocóides a bastões filamentosos podendo medir até 0,6 µm por 3 µm de tamanho (Jones & Collins, 1986). As condições ótimas de crescimento são a 37°C em pH entre 7,0 e 7,2, e a anaerobiose é facultativa. Quando cultivada em meio sólido a bactéria se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme alaranjado (Dorella *et al.*, 2006b).

A bactéria é beta-hemolítica, produz esfingomielinase fosfolipase D e catalase, mas não produz oxidase (Buxton & Fraser, 1977). As linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas de equinos e bovinos pertencem ao biovar *equi* e são capazes de reduzir nitrato a nitrito. Já as linhagens isoladas de ovinos e caprinos pertencem ao biovar *ovis* e não possuem atividade de redução de nitrato (Biberstein *et al.*, 1971). Quanto à habilidade de fermentação, todas as linhagens produzem ácido, mas não gás, a partir de diferentes fontes

de carbono, incluindo glicose, frutose, galactose, manose e sacarose (Holt *et al.*, 1994; Buxton & Fraser, 1977; Merchant & Packer, 1967).

1.2 Linfadenite Caseosa

C. pseudotuberculosis é o agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC), uma enfermidade infecto-contagiosa crônica que acomete pequenos ruminantes e está associada a perdas econômicas, principalmente na caprinovinocultura. A LC causa redução da produção de leite, lã e carne, desvalorização da pele do animal devido à presença de cicatrizes, condenação de carcaça e couro no abate e comprometimento da reprodução dos animais (Dorella *et al.*, 2006a; Paton *et al.*, 1994; Arsenault *et al.*, 2003).

A LC apresenta grande relevância para agropecuária mundial, podendo ser observada uma alta prevalência da doença em diversos países que possuem grandes rebanhos de ovinos e caprinos como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e Brasil (Arsenault *et al.*, 2003; Williamson, 2001). O nordeste brasileiro é a região mais afetada do país em virtude da maior concentração de rebanhos de caprinos e ovinos (Alves *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2001). Em Minas Gerais foi observada uma soropositividade elevada na região norte do Estado, onde cerca de 80% de caprinos e 75% de ovinos de 205 propriedades foram constatados como soropositivos para a LC (Seyffert *et al.*, 2010).

A transmissão da *C. pseudotuberculosis* entre caprinos e ovinos ocorre principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados bem como através de ferimentos superficiais na pele, os quais podem ser causados tanto por procedimentos de manejo como tosquia, castração, tratamento do cordão umbilical e agulhas contaminadas quanto por fatores naturais como arbustos pontiagudos (Williamson, 2001; Alves *et al.*, 1997).

Após a entrada no hospedeiro através da pele, feridas superficiais ou membrana mucosa, *C. pseudotuberculosis* é capturada por células fagocíticas e carregada até os linfonodos (Batey, 1986). O sucesso do processo infeccioso depende da capacidade do microrganismo de se replicar como parasita intracelular em macrófagos e de resistir à fagocitose (McKean *et al.*, 2007a). Na tentativa de conter a infecção e eliminar o parasita, ocorre a formação de granulomas que vão sofrendo necrose à medida que a lesão progride formando uma lesão caseosa que gera o aspecto macroscópico desta patologia (Jones *et al.*, 2000).

As lesões da LC podem ocorrer de forma externa ou visceral. A forma externa é caracterizada por abscessos dos nódulos linfáticos superficiais, que podem ser apalpadas externamente, e em tecidos subcutâneos. A forma visceral é caracterizada por abscesso nos nódulos linfáticos internos e em outros órgãos e tecidos como fígado, rins, parênquima pulmonar e mais raramente em coração, testículo, útero e cérebro (Arsenault *et al.*, 2003; Kuria *et al.*, 2001; Paton *et al.*, 1994).

O diagnóstico atualmente utilizado é baseado em cultura bacteriológica do material purulento, recolhido de animais com abscessos externos, e posterior identificação bioquímica e molecular. No entanto, este procedimento demanda tempo, é de alto custo e incapaz de identificar infecções subclínicas (Dorella *et al.*, 2006a).

A única forma de tratamento da doença se baseia na drenagem dos abscessos seguida pela administração de antibióticos, mas o fato das drogas não penetrarem nas cápsulas dos abscessos e apresentarem alto custo fazem com que o controle da LC seja baseado em medidas preventivas, como a eliminação dos animais infectados (Olson *et al.*, 2002; Alves e Pinheiro, 1997).

Atualmente não há uma imunoprofilaxia satisfatória para o controle da LC. Existem algumas vacinas disponíveis no mercado nacional e internacional, no entanto nem todas as vacinas licenciadas para ovinos possuem a mesma eficácia para caprinos, sendo geralmente preciso ajustar o programa de vacinação a cada caso.

Neste contexto, é necessário o desenvolvimento de vacinas e de testes diagnósticos eficazes (Dorella *et al.*, 2006b).

1.3 Determinantes moleculares de patogenicidade e virulência

Apesar da patogenia da LC ser bem entendida, pouco foi estudado sobre os determinantes moleculares de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*. (McKean *et al.*, 2007a; Dorella *et al.*, 2006b). Entre os fatores de virulência mais bem caracterizados desta bactéria estão os genes do operon *fagABC* e *gene fagD*, que codificam os componentes de um sistema de captação de ferro dentro do hospedeiro (Billington *et al.*, 2002); o gene *pld*, que codifica uma enzima secretada, denominada fosfolipase D, com atividade de esfingomielinase (Songer, 1997); e os lipídeos tóxicos da parede celular (Hard, 1972).

Trabalhos em que linhagens de *C. pseudotuberculosis* tiveram o gene *pld* inativado sugerem que a enzima auxilia na disseminação das bactérias do sítio inicial da infecção para os linfonodos, e que as linhagens deficientes para a fosfolipase D causam danos mínimos para o hospedeiro (McNamara *et al.*, 1994; Hodgson *et al.*, 1992). Segundo

McKean *et al.* (2007a; 2007b), este fator de virulência tem sua expressão reduzida quando a *C. pseudotuberculosis* é exposta ao choque térmico (43°C), e aumentada quando as bactérias infectam macrófagos.

De forma similar, uma linhagem mutante para o gene *fagB* tem habilidade reduzida de sobreviver e de causar abscessos em caprinos infectados experimentalmente, devido à incapacidade da linhagem mutante de obter ferro dentro do organismo hospedeiro (Billington *et al.*, 2002).

Segundo Alves *et al.* (1997), os lipídeos da parede celular de *C. pseudotuberculosis* permitem a aderência do microrganismo na superfície de células do hospedeiro e promovem uma citotoxicidade local, além de formarem uma camada lipídica que protege a bactéria contra a ação degradativa das enzimas presentes no fagolisossomo do hospedeiro. A toxicidade do material lipídico foi demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias e um estudo afirma que existe uma relação direta entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de abscessos crônicos (Muckle & Gyles, 1982; Jolly, 1966).

1.4 Modulação da expressão gênica e adaptação

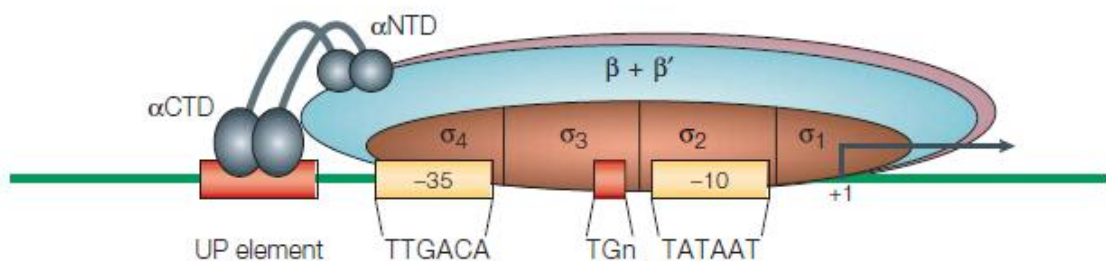
Durante o curso de infecção, *C. pseudotuberculosis* é exposta a diferentes condições ambientais e precisa resistir à resposta imunológica do hospedeiro, principalmente durante a fase intracelular onde a bactéria enfrenta diversos tipos de estresses dentro do fagolisossomo, um ambiente extremamente hostil, com baixo pH, alta atividade proteolítica e grande potencial oxidativo e nitrosativo (Schaible, 2009; Rohde *et al.*, 2007; McKean *et al.*, 2007a).

Consequentemente, os mecanismos utilizados pela bactéria para responder a diferentes tipos de estresse são essenciais para sua sobrevivência e proliferação. Na maioria dos casos, a resposta bacteriana leva à ativação transiente de genes cujos produtos respondem a um dado estresse físico-químico (Schaible, 2009; Rohde *et al.*, 2007; Bashyam & Hasnain, 2004). Fatores que regulam esses genes respondem a sinais específicos, ambientais (externos) ou celulares, estimulando ou inibindo a transcrição, tradução ou algum outro evento na expressão gênica de modo a modificar adequadamente a taxa de síntese dos produtos gênicos, proporcionando a adaptação fisiológica e bioquímica necessária (Dow e Daniels, 2000).

Em procariotos a modulação da expressão gênica, em nível transcricional, é realizada pelos fatores sigma da enzima RNA polimerase. Sendo que alguns fatores sigma são essenciais para uma infecção de sucesso e são considerados como fatores associados à virulência. Neste contexto, trabalhos recentes têm dedicado atenção ao estudo das proteínas envolvidas na regulação da expressão gênica tais como os fatores sigma bacterianos, na busca por novos determinantes moleculares de patogenicidade (Bashyam & Hasnain, 2004).

1.5 Fatores sigma bacterianos

Os fatores sigma (σ) são reguladores transcricionais que compreendem uma classe de proteínas dissociáveis do cerne da RNA polimerase (RNAP) bacteriana. O cerne da RNAP, composto por cinco subunidades (α_1 , α_2 , β , β' e ω), não apresenta afinidade específica pelo DNA, a menos que ele se associe a subunidade σ capaz de reconhecer promotores gênicos específicos (Figura 1). Cada um dos vários fatores sigmas é requerido para a transcrição direta ou indireta de um subconjunto específico de genes, denominado *regulon* (Mooney *et al.*, 2005; Cases & De Lorenzo, 2005).



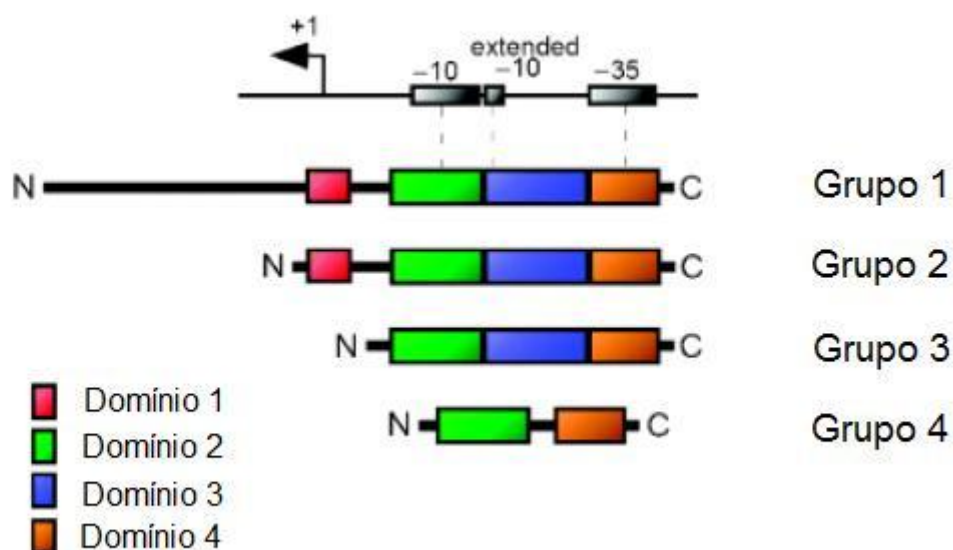
Adaptado: Browning & Busby, 2004

Figura 1. Representação esquemática da holoenzima RNA polimerase no sítio inicial de transcrição. A fita reconhecida de DNA está representada pela linha verde. As cinco subunidades da holoenzima podem ser vistas, incluindo os 4 domínios proteicos da subunidade σ . As sequências promotoras consenso -10 (TATAAT) e -35 (TTGACA) são reconhecidas respectivamente pelos domínios 2 e 4 da subunidade σ .

1. 5. 1 Classificação dos fatores sigmas

Os fatores sigma podem ser classificados em duas famílias; σ^{70} (devido a sua similaridade com o fator sigma primário de 70 kDa de *Escherichia coli*) e σ^{54} (devido a sua similaridade com o fator sigma de 54 kDa, responsável pela regulação do metabolismo de nitrogênio em *E. coli*). Os fatores do tipo σ^{54} normalmente não são encontrados em bactérias gram-positivas com alto conteúdo G+C. De maneira geral, nas espécies portadoras do fator σ^{54} , este está envolvido na assimilação do nitrogênio, além de controlar vários outros processos celulares, como a motilidade, o transporte de nutrientes, a formação de pili, a sinalização celular e a tolerância ao zinco, sendo que os fatores sigma desta família reconhecem as regiões promotoras -12 e -24 para ativar a transcrição gênica (Sachdeva *et al.*, 2009; Kazmierczak *et al.*, 2005).

Em contraste, todas as espécies de bactérias possuem pelo menos um fator sigma primário, pertencente à família σ^{70} , que ativa a transcrição da maioria dos genes constitutivos (*housekeeping*) através do reconhecimento das regiões promotoras -10 e -35 (Sachdeva *et al.*, 2009). A família σ^{70} pode ainda ser subdividida em quatro grupos dependendo dos domínios protéicos que possuem (Figura 2). O primeiro grupo é composto pelos fatores sigma primários, os quais são essenciais para a viabilidade bacteriana e apresentam os domínios 1, 2, 3 e 4 (Sachdeva *et al.*, 2009; Rodrigue *et al.*, 2006). O segundo grupo é composto por fatores sigma estruturalmente próximos aos fatores sigma primários, embora não sejam essenciais para a sobrevivência das bactérias em condições normais de crescimento. Os fatores sigma do terceiro grupo não possuem o domínio 1 e estão relacionados a funções específicas como a esporulação e formação de flagelo. O quarto grupo é o maior e mais diverso entre todos, os fatores sigma deste grupo contêm apenas os domínios 2 e 4 sendo denominados fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF) (Gruber *et al.*, 2003).



Adaptado: Rodrigue *et al.*, 2006.

Figura 2. Domínios conservados dos 4 grupos de fatores sigma da família σ^{70} . O domínio 1 inibe fatores sigma dissociados do cerne da RNAP de se ligarem ao DNA. O domínio 2 é responsável por reconhecer o elemento -10 da região promotora do gene, enquanto que o domínio 3 reconhece sequências específicas nas extensões a montante do elemento -10. O domínio 4 é responsável pelo reconhecimento de sequencias consenso do elemento -35 de promotores gênicos.

1. 5. 2 Fatores sigmas alternativos

Sob condições fisiológicas normais, são majoritariamente expressos os genes essenciais para a sobrevivência e o crescimento bacteriano, os quais possuem promotores que são reconhecidos pelos fatores sigma do grupo 1 da família σ^{70} (Borukhov *et al.*, 2003). Entretanto, as bactérias precisam se adaptar frequentemente às mudanças do ambiente, e no caso das bactérias patogênicas isso significa ter que resistir à resposta imunológica do hospedeiro. Um dos mecanismos de adaptação mais comuns é a substituição de um fator sigma primário ligado ao cerne da RNA polimerase por um fator sigma alternativo, de modo a ativar a expressão de um conjunto específico de genes envolvidos na resposta adaptativa necessária (Kazmierczak *et al.*, 2005; Helmann, 2002).

Os fatores sigma alternativos podem ser agrupados em três classes distintas, dependendo do tipo de função que exercem: fatores sigma ativadores de mecanismos gerais de resposta ao estresse, os quais apresentam grande similaridade estrutural com os fatores sigma primários; fatores sigma envolvidos principalmente nas alterações morfológicas do organismo, como a formação de flagelos e esporulação; e fatores sigma de função extracitoplasmática, os quais estão envolvidos na ativação de mecanismos de adaptação às mudanças no periplasma, na membrana da bactéria e no ambiente extracelular (Potvin *et al.*, 2008; Kazmierczak *et al.*, 2005).

Um dos primeiros fatores sigma alternativos identificados foi o fator σ^B de *Bacillus subtilis*, o qual possui domínios similares aos dos fatores sigma primários. Um estudo revelou que, em linhagens de *C. glutamicum*, as sequências consenso a -10 nos promotores dos genes mais fortemente ativados por este fator sigma alternativo são idênticas as dos genes *housekeeping*, sugerindo que o σ^B poderia funcionar como um regulador reserva, já que ele é capaz de ativar a transcrição de genes cujos promotores são similares aos reconhecidos pelos fatores sigma primários (Nesvera & Patek, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que o fator σ^B está relacionado aos mecanismos gerais de resposta ao estresse. O fator σ^B de *B. subtilis* regula pelo menos 127 genes envolvidos em diversas funções, dentre as quais se destacam a resistência ao etanol, às temperaturas elevadas e à acidez (Kazmierczak *et al.*, 2005). O gene *sigB* de *C. glutamicum* é expresso principalmente durante a transição da fase de crescimento exponencial para a fase estacionária, enquanto ocorre simultaneamente uma redução da expressão do gene *sigA*, que codifica um fator sigma primário (Nesvera & Patek, 2008; Larisch *et al.*, 2007).

Em *B. subtilis* o processo de esporulação é coordenado pelos fatores sigma E, F, G, H e K enquanto que a formação de flagelo depende da atividade do fator sigma D. Alguns fatores sigma envolvidos em alterações morfológicas possuem um papel duplo, podendo ativar também genes de resposta ao estresse (Gruber *et al.*, 2003).

1. 5. 3 Fatores sigma de função extracitoplasmática

Os fatores sigma ECF ativam a transcrição de genes envolvidos em processos relacionados ao envoltório celular bacteriano, incluindo secreção, síntese de exopolissacarídeos, influxo/efluxo de ferro, e síntese de proteases extracelulares. Eles se

destacam entre os demais fatores sigma alternativos por controlarem processos que são importantes para a infecção (Jordan *et al.*, 2008; Bashyam & Hasnai, 2004; Helmann, 2002).

Geralmente fatores sigma ECF são co-transcritos com reguladores negativos denominados anti-sigma. Estes por sua vez agem como proteínas antagonistas que se ligam ao fator sigma impedindo que ele se associe ao cerne da RNA polimerase. Os fatores anti-sigma mais comuns se tratam de proteínas transmembrânicas com um domínio sensorial extracitoplasmático e um domínio intracelular inibitório (Yoshimura *et al.*, 2004; Raivio *et al.*, 2001).

A Relação entre o sigma e o anti-sigma é semelhante a de um sistema duplo componente de transdução de sinal. Este sistema tem como função vincular um estímulo externo a mecanismos de resposta adaptativa específicos e em procariotos, geralmente, são constituídos de uma proteína histidina-quinase sensorial e uma proteína reguladora de resposta (West *et al.*, 2001). Na presença de sinais específicos gerados devido a modificações no ambiente extracelular, o fator anti-sigma é inativado por degradação proteolítica ou por modificações conformacionais, acarretando a liberação do fator sigma, o qual pode então se ligar a RNA polimerase para estimular a transcrição de genes específicos.

No caso dos fatores sigmas ECF também é muito comum que a transcrição dos genes codificadores de cada fator sigma ECF seja regulada pelo próprio fator σ que está sendo produzido ou por um ou mais fatores σ distintos (Helmann, 2002). A autoregulação positiva que ocorre em muitos fatores σ serve para amplificar o sinal produzido pela liberação deste fator σ ativo do complexo inativo σ -anti- σ (Nesvera & Patek, 2008; Helmann, 2002).

1. 5. 3. 1 Envolvimento de fatores sigma ECF na virulência bacteriana

Em um trabalho pioneiro envolvendo os fatores sigmas ECF de *M. tuberculosis*, Manganelli e colaboradores (1999) desenvolveram um sistema de PCR em tempo real para avaliar simultaneamente a expressão diferencial dos 10 fatores σ ECF presentes no genoma desta espécie, sob diversas condições ambientais, sendo que σ^E e σ^H tiveram níveis de transcrição aumentados após choque térmico e também responderam ao estresse de superfície celular induzido por tratamento com SDS (Manganelli *et al.*, 1999).

Um exemplo importante de σ ECF envolvido na virulência compreende o fator homólogo de σ^E da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (gene *algU/algT*). Isolados patogênicos de *P. aeruginosa* produzem um exopolissacarídeo abundante conhecido como alginato, que é considerado um dos principais fatores de virulência dessa bactéria. O fator *algU*, além de controlar a expressão dos genes de resposta ao estresse oxidativo, também regula as enzimas da via de biossíntese do alginato (Potvin *et al.*, 2008). Similarmente, o fator σ^E de *Salmonella enterica* var. Typhimurium também regula genes que proporcionam resistência ao estresse oxidativo, auxiliando na sobrevivência da bactéria dentro de macrófagos (Kazmierczak *et al.*, 2005).

Através da produção de uma linhagem de *M. tuberculosis* mutante para o fator σ^H foi observado que esta se tornou mais sensível aos estresses térmico e oxidativo (Manganelli *et al.*, 2002). Esta linhagem também se mostrou significativamente atenuada em relação à linhagem selvagem em modelo murino, apesar de ser capaz de sobreviver e de proliferar no interior de macrófagos, o que indica que este fator sigma é importante para a virulência da bactéria (Kaushal *et al.*, 2002). Através de estudos de microarranjo, foi verificado que o fator σ^H regula a transcrição de proteínas do choque térmico, do operon *trxB2C*, que codifica as enzimas tiorredoxina redutase e tiorredoxina, as quais são importantes para a resposta ao estresse oxidativo, e de proteínas envolvidas na biossíntese da cisteína e no metabolismo da glicose. Além disso, nesta bactéria o fator σ^H regula sua própria expressão e a expressão dos fatores σ^B e σ^E (Manganelli *et al.*, 2002)

O fator σ^K , que também apresenta função extracitoplasmática, é conhecido por seus *regulons* relativamente pequenos e pelo seu importante papel na transcrição de genes codificadores de proteínas imunogênicas, como *mpb87* e *mpb70* de *M. bovis*. Algumas linhagens atenuadas desta espécie (conhecidas por BCG) apresentam uma mutação no códon iniciador do gene *sigK*, a qual está relacionada à fraca expressão deste gene e, como consequência, à virulência reduzida da bactéria (Charlet *et al.*, 2005).

Uma vez que estes 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, o número de fatores sigma ECF geralmente se correlaciona com a variabilidade de ambientes encontrados por uma dada espécie bacteriana (Sachdeva *et al.*, 2009).

Análises comparativas entre sequências genômicas bacterianas disponíveis em bancos de dados revelaram uma ampla variação no número de genes de fatores sigma ECF entre diversos microrganismos: 2 em *E. coli*, 7 em *B. subtilis*, 10 em *M. tuberculosis*, 19 em *P. aeruginosa*, 50 em *Streptomyces coelicolor* e 83 em *Sorangium cellulosum* (Helmann,

2002). Dentre as espécies do gênero *Corynebacterium*, as patogênicas *C. diphtheriae* e *C. jeikeium* apresentam 7 genes de prováveis fatores sigma ECF, enquanto que as ambientais *C. glutamicum* e *C. efficiens* apresentam somente 5 (Staron *et al.*, 2009; Jordan *et al.*, 2008).

1.6 Estudo de fatores sigmas em *C. pseudotuberculosis*

Após a finalização do Projeto Genoma de *C. pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais e Rede Paraense de Genômica e Proteômica foi possível a identificação de sete fatores sigma alternativos nesta bactéria: o fator sigma B de resposta geral ao estresse e os fatores sigma C, D, E, H, K e M de função extracitoplasmática. Uma observação interessante é que a corinebactéria de interesse biotecnológico *C. glutamicum* não possui o fator σ^K , sugerindo que este pode estar envolvido em algum mecanismo de virulência em *C. pseudotuberculosis*. Estes fatores foram identificados através da análise do genoma de *C. pseudotuberculosis*, utilizando as ferramentas de bioinformática disponíveis no banco MiST2 (*Microbial Signal Transduction database*) (Pacheco, 2010).

O genoma de *C. pseudotuberculosis* possui um fator sigma (*sigA*) homólogo ao fator sigma primário σ^{70} de *E. coli*, portanto este provavelmente deve ser fator o responsável pela ativação de genes constitutivos em *C. pseudotuberculosis*. Um fato intrigante foi encontrado no trabalho de Castro (2009) ao realizar análises com PCR em tempo real onde foi aplicado estresse oxidativo proveniente de peróxido de hidrogênio. Observou-se em *C. pseudotuberculosis* 1002 no início da fase exponencial após 15 minutos de estresse que o *sigA* apresentou aumento na expressão, apesar de não ter ocorrido uma diferença significativa em relação ao controle.

Um estudo em *E. coli* sugeriu que o fator sigma primário poderia reconhecer genes envolvidos na resposta ao estresse. Especificamente, foi demonstrado que a indução do gene *rpoD*, codificante do σ^{70} , ocorre pela falta de aminoácido e choque térmico (Taylor *et al.*, 1984). Em *C. pseudotuberculosis* 1002, como *sigA* mostrou alteração na expressão entre controle e estresses, pode ser que ele esteja exercendo também sua função de fator sigma alternativo.

Através da técnica de RNA-seq em um estudo de transcriptoma realizado por Pinto (2011) foi observado que o fator σ^B de *C. pseudotuberculosis* 1002 teve sua expressão aumentada frente ao estresse ácido, sendo altamente induzido, com uma razão de expressão três vezes maior que no controle.

No trabalho de Domingueti (2011), através do emprego de plasmídeo suicida, foi possível avaliar a diferença no crescimento e viabilidade na linhagem mutante para *sigC* e selvagem (*C. pseudotuberculosis* 1002) frente a diferentes estresses e diferentes tempos de exposição, no início da fase exponencial. Os resultados mostraram que a linhagem mutante foi mais sensível aos estresses oxidativo, osmótico e térmico que a selvagem indicando que o fator σ^C , possivelmente, desempenha importante papel na sobrevivência da bactéria no ambiente hostil.

No genoma de *C. pseudotuberculosis* 1002, o gene *sigC* está localizado na fita reversa há uma distância de apenas 47 aminoácidos do gene codificante da catalase, que está na fita direta, e está envolvido também na proteção contra o estresse oxidativo. Então é possível sugerir que *sigC* esteja envolvido na regulação de catalase. Além disso, através de análises dos genes presentes em ilhas de patogenicidade, foi verificado que o gene que codifica o fator σ^C se encontra na PICp5, o que sugere que o fator σ^C possa desempenhar um papel importante na virulência desta bactéria (Domingueti, 2011).

No trabalho de Souza (2011), foi construída uma linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* 1002 deficiente para o gene *sigH* e submetida, assim como a linhagem selvagem, a diferentes condições de estresse. Foi verificado que esta linhagem é significativamente mais susceptível ao estresse osmótico do que a linhagem 1002, indicando que o fator σ^H deve desempenhar um papel importante para a resposta da bactéria a esta condição de estresse. No trabalho de Pinto (2011), o gene *sigH* foi induzido e considerado significativo nas condições de estresse térmico, osmótico e ácido, sendo altamente expresso na última condição.

Castro (2009) em seu trabalho com *C. pseudotuberculosis* 1002 observou um aumento de expressão do gene *sigM*, que codifica o fator σ^M , somente após 270 min de aplicação do estresse oxidativo. Em *C. glutamicum* experimentos revelaram que uma deleção do *sigM* causou redução na viabilidade celular diante da aplicação do estresse por choque térmico e dissulfeto (subtipo do estresse oxidativo) na cultura em fase de crescimento exponencial. Além disso, experimentos com PCR em tempo real demonstraram que a transcrição de *sigM* aumentou significativamente depois da aplicação destes estresses. Estes resultados sugerem que este fator está envolvido na resposta ao estresse (Nakunst et al., 2007), contudo, há um forte indício de que seja em fase mais tardia de crescimento. De forma similar, com relação ao fator sigma K, Castro (2009) somente detectou forte indução deste gene de *C. pseudotuberculosis* após 270 min de exposição ao peróxido de hidrogênio.

1. 6. 1 Fator sigma E

O fator σ^E se destaca entre os sigmas ECF por ser o fator sigma mais estudado da atualidade e afetar a resistência de patógenos como *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* a estresses extracitoplasmáticos (Muller *et al.*, 2009). Diversos estudos prévios sobre a resposta de *M. tuberculosis* a condições de estresses encontradas dentro de células fagocíticas demonstraram o papel do fator sigma E na sobrevivência intracelular da bactéria (Fontán *et al.*, 2008; Talaat *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2003; Schnappinger *et al.* 2003).

Em *C. pseudotuberculosis*, através de um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, Pacheco *et al.* (2012) demonstraram que o fator sigma alternativo ECF σ^E desempenha um papel essencial na resistência desta bactéria às condições de estresse encontradas no ambiente intrafagossômico. Em particular, a deficiência do gene *sigE* de uma linhagem mutante levou à maior sensibilidade a concentrações fisiológicas de estresse nitrosativo, ácido e de superfície (pH 5.5) destacando seu papel na resposta adaptativa de *C. pseudotuberculosis*.

Ainda neste trabalho realizado por Pacheco (2012), onde foram avaliadas proteínas diferencialmente secretadas nas linhagens selvagem 1002 e mutante ($\Delta sigE$) em condições de estresse nitrosativo, foi possível observar uma proteína, ADL20030.1, supostamente envolvida com a resposta a este tipo de estresse. Esta proteína se trata de uma provável dioxigenase de óxido nítrico identificada somente no exoproteoma da linhagem selvagem 1002 tratada com NO. Proteínas dioxigenases estão envolvidas com detoxificação de óxido nítrico em outras bactérias (Mitsumoto *et al.*, 1999; Gardner *et al.*, 1998), o que faz desta proteína uma boa candidata para explicar a maior resistência da linhagem selvagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* ao estresse nitrosativo.

Além disso, experimentos de infecção de camundongos deficientes para a enzima óxido nítrico sintase indutível (nocautes iNOS^{-/-}) onde a linhagem mutante $\Delta sigE$ de *C. pseudotuberculosis* mostrou-se muito mais virulenta após infecção de camundongos nocautes iNOS^{-/-} do que de animais selvagem C57BL/6, foram sugestivos de que o fator σ^E contribui também para a resistência ao estresse nitrosativo *in vivo* e para a virulência de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco, 2012).

Através de um experimento de RNA-seq, de um estudo recente de transcriptômica, Pinto (2011) submeteu a linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* aos estresses ácido, térmico e osmótico e foi observado que um conjunto de genes que inclui o gene *sigE* foram ativados quando a linhagem 1002 é exposta a um meio de cultura ácido (pH 5.0)

corroborando com os resultados de Pacheco (2010) de susceptibilidade ao estresse ácido da linhagem deficiente para o fator sigma E.

1. 6. 1. 1 Estrutura da unidade transcricional de *sigE*

Em *M. tuberculosis* o gene *sigE* é regulado a partir de 3 promotores diferentes, dependendo do tipo de estímulo que a célula recebe. O primeiro é reconhecido pelo sigma H, o segundo é regulado por mprAB de um sistema de 2 componentes, e o terceiro ainda não foi completamente caracterizado (Dona *et al.*, 2008). De modo similar, em *C. pseudotuberculosis*, através de análises *in silico* nosso grupo de pesquisa identificou 3 promotores ao longo de uma região de 1000 pares de bases a montante (*upstream*) da janela de leitura (ORF- *Open Reading Frame*) do gene *sigE* (Pacheco, 2010).

Outro fato interessante, é que no genoma de *C. pseudotuberculosis* 1002 existem dois genes, *cseE* e *tatB*, respectivamente localizados imediatamente à jusante (*downstream*) da janela de leitura do gene *sigE* (Figura 3), então talvez poderiam estar organizados em *operon*.

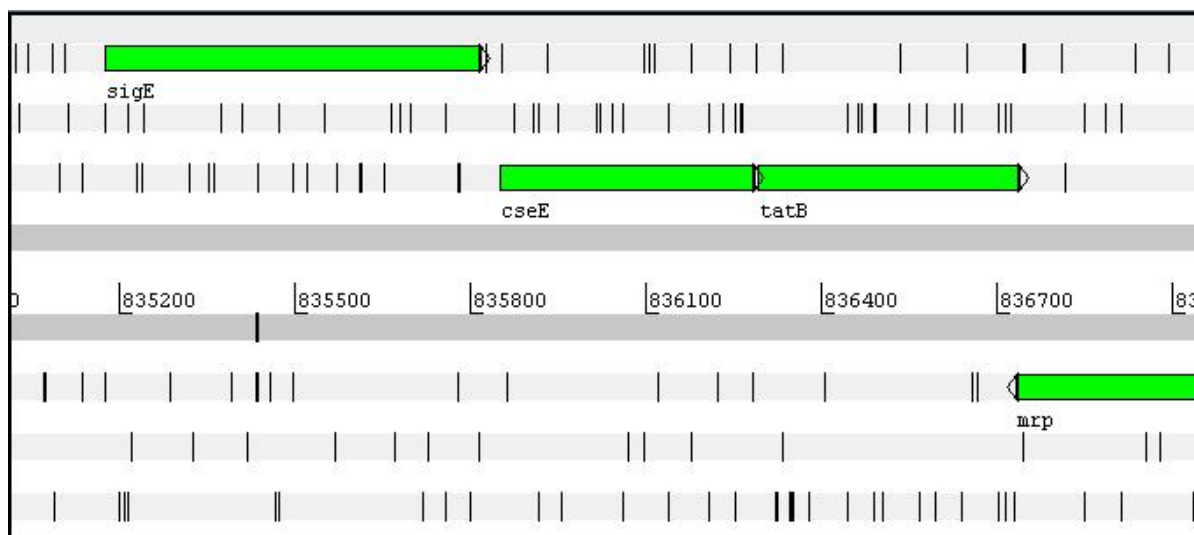


Figura 3. Visualização da disposição dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* na fita direta do genoma de *C. pseudotuberculosis* 1002 pelo software Artemis.

Um *operon* é composto por 2 ou mais genes transcritos em uma mesma molécula de RNA mensageiro (mRNA), e geralmente são identificados através da distância intergênica e pela presença de promotores e terminadores. Genes de procaríotos estão frequentemente organizados em *operons* e tem sido demonstrado que genes co-transcritos estão funcionalmente relacionados e constituem parte de uma mesma via metabólica. Portanto, a compreensão da organização dos genes permite um melhor entendimento das funções gênicas de um determinado genoma (Okuda *et al.*, 2007).

O gene *cseE* de outras bactérias evolutivamente próximas, como *C. glutamicum* e *M. tuberculosis* codifica um fator anti-sigma (Dona *et al.*, 2008). Em *C. glutamicum*, um estudo comprovou que os genes *sigE* e *cseE* são transcritos conjuntamente e que as proteínas do fator sigma E e do fator anti-sigma interagem entre si fisicamente (Park *et al.*, 2008).

O gene *tatB* de espécies do gênero *Mycobacterium* codifica um dos componentes de um sistema alternativo de secreção de proteínas completamente dobradas, o sistema de translocação de argininas consecutivas (do inglês *Twin-Arginine Translocation* - TAT). Neste gênero foi sugerido que este sistema de secreção participe da resposta adaptativa a estresses ambientais, como exemplo através da secreção de proteínas detoxificantes e que conferem resistência a antibióticos (Posey *et al.*, 2006). No trabalho de Pinto (2011), ambos os genes, *cseE* e *tatB* de *C. pseudotuberculosis* tiveram o nível de expressão aumentado em resposta ao estresse ácido, assim como o gene *sigE*.

1.7 Justificativa

A LC é uma doença de distribuição mundial que causa importantes perdas econômicas para a atividade da ovinocaprinocultura. O processo patogênico da doença está relativamente bem entendido, entretanto, maiores estudos em relação às bases moleculares da virulência da *C. pseudotuberculosis* são necessários para a descoberta de novos alvos para o combate à doença.

Na busca por compreender a regulação da expressão gênica envolvida na resposta adaptativa desta bactéria, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo dos fatores sigma alternativos da RNA polimerase, visto que em diversos patógenos estes fatores ativam a transcrição de genes de virulência e genes associados a virulência.

Trabalhos prévios, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que o fator sigma E de *C. pseudotuberculosis* está envolvido na resposta adaptativa desta bactéria visto que sua resistência e virulência foram afetadas pela deficiência do fator sigma E quando a bactéria foi exposta a estresses extracelulares *in vitro* e *in vivo*. Contudo, novas investigações são necessárias para confirmação da ativação deste fator durante a resposta da bactéria ao estresse nitrosativo. A possibilidade do gene codificador do fator sigma E de *C. pseudotuberculosis*, *sigE*, estar organizado em *operon* juntamente com os genes *cseE* e *tatB* também deve ser investigada pois a expressão destes genes poderia estar vinculada à do *sigE* e também estarem envolvidos na resposta ao estresse. Um estudo aprofundado sobre a expressão destes genes ainda não foi realizado. Somente um experimento de RNA-seq sugere que os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* têm expressão aumentada quando *C. pseudotuberculosis* é exposta ao estresse ácido (Pinto, 2011). Portanto, a compreensão da organização dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* e avaliação da expressão destes genes de *C. pseudotuberculosis* frente a condições de estresse específicas permitiria um melhor entendimento de suas funções gênicas.

Neste contexto, o presente trabalho se propõe a confirmar o aumento da expressão destes genes em resposta aos estresses nitrosativo e ácido, tendo em vista o envolvimento deste fator na resposta a estes estresses, assim como também avaliar se a transcrição destes genes ocorre de forma conjunta.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a transcrição diferencial do gene codificador do fator sigma E de *C. pseudotuberculosis* e dos genes dispostos imediatamente a jusante deste, *cseE* e *tatB*, em resposta aos estresses nitrosativo e ácido, bem como avaliar se estes três genes compõem uma única unidade transcricional nesta bactéria.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os prováveis promotores e caracterizar as unidades transcricionais codificadas pelo *locus* envolvendo os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* de *C. pseudotuberculosis* através de análises *in-silico*;
- Avaliar se os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* são expressos em uma mesma unidade transcricional, através da técnica de RT-PCR;
- Avaliar a susceptibilidade da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* aos estresses nitrosativo e ácido por meio de curvas de crescimento.
- Estabelecer e validar metodologias de extração de RNA total de *C. pseudotuberculosis*, transcrição reversa e qPCR.
- Avaliar a expressão diferencial dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* de *C. pseudotuberculosis* em resposta aos estresses nitrosativo e ácido, induzidos *in vitro*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Equipamentos utilizados

- Aferidor de pH (Labmeter)
- Agitador magnético de soluções (TradeLab)
- Agitador tipo *vortex* (Scientific Industries)
- Analisador de amostras “NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- Aparato para eletroforese “Horizon[®] 58” (Gibco[®])
- Autoclave (Phoenix)
- Balança eletrônica (Shimadzu)
- Banho-maria (Precision)
- Capela de manipulação “DNA Workstation” (Loccus Biotecnologia)
- Capela de exaustão química (Permutation[®])
- Centrífuga “5417C” (Eppendorf)
- Centrífuga refrigerada “MR 23i” (Jouan)
- Destilador de água “Direct-Q[®] 3” (Millipore[™])
- Espectrofotômetro “BioPhotometer Plus” (Eppendorf)
- Estufa incubadora (Nova Ética)
- Fluxo laminar classe II (Esco)
- Freezer -20°C (Electrolux)
- Freezer -80°C (Sanyo)
- Geladeira (Brastemp)
- Homogeneizador de amostras “Precellys 24” (Bertin Technologies)
- Incubadora do tipo *shaker* (Nova ética)
- Micropipetas
- Termociclador
- Termociclador 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems[™])
- Transiluminador (UVP)

3.2 Reagentes utilizados

- 2-mercaptoetanol (2-ME, Sigma Aldrich[®])
- Agarose padrão (Agargen)
- Água mili-Q esterilizada em autoclave

- Brometo de Etídio (Eurobio™)
- *Diethylenetriamine NONOate* (Cayman Chemical)
- Etanol (Synth®)
- Ácido clorídrico 37% (HCl, Merck™)
- NaOH (Synth®)
- Tween® 80 (Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO, Sigma Aldrich®)

3.3 Kits de biologia molecular

- 1 kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen™)
- High Capacity cDNA Master Mix (Applied Biosystems™)
- Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™)
- RNAprotect® Bacteria Reagent (Qiagen™)
- RNase-Free DNase Set (Qiagen™)
- RNeasy® MinElute® Cleanup (Qiagen™)
- RNeasy® Mini Kit (Qiagen™)

3.4 Ferramentas de Bioinformática

Na caracterização *in silico* do locus do gene *sigE* foi utilizado o *software* DOOR v2.0 (*Database of prokaryotic Operons*), que atualmente é a maior base de dados de *operons*, obtidos de 971 genomas de procariotos através de um algoritmo classificador de mineração de dados (Mao *et al.*, 2009). Algumas das características avaliadas pelo software são: distância intergênica, conservação da região do gene, distância filogenética e informações de motivos de DNA. Além da predição do *operon* de *C. pseudotuberculosis* 1002, foi feita uma busca por genes homólogos ao *sigE* de espécies do grupo CMNR, na base de dados de *operons* do DOOR v2.0 a fim de comparar o resultado da predição em *C. pseudotuberculosis* 1002 com os de espécies evolutivamente próximas.

Além das análises pelo DOOR v2.0, uma sequência de cerca de 2Kb contendo as ORFs e regiões intergênicas dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* da linhagem 1002 foi submetida à uma análise para identificar possíveis promotores pelas ferramentas “BPRM” (SoftBerry) e “NNPP” (*Neural Network Promoter Prediction*) e também para identificar sítios de término de

transcrição rho-independentes através das ferramentas “FindTerm” (SoftBerry), ARNold e “WebGeSTer” (Gautheret & Lambert, 2001; Macke et al., 2001). A ferramenta DOOR pode ser encontrada no site http://csbl1.bmb.uga.edu/OperonDB_10142009/DOOR.php e as demais ferramentas no site <http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>.

3.5 Linhagem bacteriana e condições de cultivo

A linhagem de *C. pseudotuberculosis* 1002, isolada de caprino naturalmente portador da LC e cedida pela Universidade Federal da Bahia foi utilizada neste trabalho. Para os experimentos de resistência ao estresse e de expressão gênica a linhagem 1002 foi cultivada em meio quimicamente definido (MQD), a 37°C acrescido de Tween[®] 80 à concentração final de 0,05%, como previamente descrito (Tabela 1) (Moura-Costa *et al.*, 2002).

Para a quantificação de unidades formadoras de colônia (ufc) da linhagem 1002 foi utilizado o caldo infusão cérebro-coração (BHI) sólido (1,5% de ágar bacteriológico), a 37°C por 48-72 horas em placas de petri.

Tabela 1. Meio quimicamente definido para cultivo de *C. pseudotuberculosis*.

Tampão fosfato		Vitaminas		Aminoácidos	
(g/L)		(g/L)		(g/L)	
Na ₂ HPO ₄	12,93	Pantotenato de Ca	0,0040	Arginina	0,0632
KH ₂ PO ₄	2,55	Cloreto de Colina	0,0040	Cisteína	0,0120
NH ₄ Cl	1,00	Ácido Fólico	0,0040	Histidina	0,0210
CaCl ₂	0,02	Inositol	0,0080	Isoleucina	0,0263
MgSO ₄	0,20	Niacinamida	0,0040	Leucina	0,0262
Glicose	12,00	Piridoxal	0,0040	Lisina	0,0363
		Riboflavina	0,0004	Metionina	0,0076
		Tiamina HCl	0,0040	Fenilalanina	0,0165
				Treonina	0,0238
				Triptofano	0,0051
				Tirosina	0,0180
				Valina	0,0234
				Alanina	0,0089
				Asparagina	0,0132
				Ác. Aspártico	0,0133
				Ác. Glutâmico	0,0133
				Glicina	0,0075
				Serina	0,0105

ADAPTADO: Moura-Costa et al., 2002.

3. 5. 1 Condições de estresse *in vitro*

3. 5. 1. 1 Estresse nitrosativo

Para submeter a linhagem bacteriana 1002 à condição de estresse nitrosativo, foi adicionado um agente doador de óxido nítrico (NO) NONOato de dietilenotriamina (DETA/NO) [C₄H₁₃N₅O₂] ao meio de cultura. O reagente foi preparado em solução alcalina de NaOH e diluído em tampão fosfato (PBS) no momento do uso, de acordo com as concentrações otimizadas por Pacheco (2010), que estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Quantidade de DETA/NO empregada neste trabalho.

Reagente	Concentração do estoque	Concentração de trabalho	Concentração final
(DETA/NO) [C ₄ H ₁₃ N ₅ O ₂]	100 mM em solução de NaOH 5 mM (pH = 12)	10 mM em PBS 1M (pH = 7.4)	100µM em cultura de bactérias

(Pacheco, 2010).

3. 5. 1. 2 Estresse Ácido

Para submeter a linhagem bacteriana 1002 à condição de estresse por acidez, os frascos de cultivo em MQD foram centrifugados e o sobrenadante descartado. O precipitado bacteriano foi ressuscitado em meio MQD a 37°C acrescido de HCl (pH 5,5).

3. 6 Avaliação da susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* aos estresses nitrosativo e ácido

A susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* aos estresses nitrosativo e ácido foi avaliada após a aplicação dos mesmos em culturas na fase de crescimento exponencial inicial (Pacheco, 2010). Foi preparado um pré-inóculo com a deposição de alíquota do estoque bacteriano (mantido a -80°C) em 10 mL de MQD. Após 24 horas de crescimento a 37°C e sob agitação a 140 rpm, parte do cultivo foi reinoculado em frasco contendo 20 mL de MQD fresco e aquecido a 37°C, de modo a se obter $DO_{600nm} \approx 0,02$ em espectrofotômetro. A cultura foi constantemente monitorada até atingir a fase exponencial inicial de crescimento ($DO_{600nm} \approx 0,4$). Neste ponto, as culturas foram divididas em alíquotas controle (não tratada) e alíquotas tratadas onde foram aplicados os estresses nitrosativo e ácido em 10ml de cultura (itens 3.5.1.1 e 3.5.1.2). Foram então extraído 100 µL de cada cultura e submetidos a diluições seriadas em 900 µL de solução salina 0,9%. Foram realizados plaqueamentos em duplicatas para as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} com a finalidade de se confirmar a viabilidade celular.

O monitoramento das curvas de crescimento seguiu por meio de leituras de DO_{600nm} para os tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h e plaqueamento de diluições seriadas para os tempos 3h e

6h após a aplicação dos estresses. As placas de petri semeadas foram mantidas em incubadora a 37°C até a visualização de colônias. Os dados de DO_{600nm} e de ufc/mL foram processados e representados com auxílio do *software* GraphPad Prism v.5.0. O cálculo das áreas sob as curvas (ASC) foi realizada utilizando o mesmo *software*, e o índice de crescimento percentual das bactérias tratadas em comparação com as bactérias crescidas sob condições normais (utilizando a formula $IC (\%) = (ASC_{Tratado} / ASC_{Controle}) \times 100$) foi estimado.

3. 7 Análises transcricionais

3. 7. 1 Amostragem utilizada para a obtenção de RNA total

Para a obtenção do RNA total de *C. pseudotuberculosis*, foram isoladas alíquotas de 3 culturas para cada condição avaliada após 15 min da aplicação do estresse. Da mesma forma o RNA total foi extraído das culturas controle.

Alíquotas de 500 µL foram retiradas dos frascos das culturas controle e das culturas que foram submetidas ao estresse. Após, o “RNAprotect® Bacteria Reagent” foi adicionado às alíquotas de acordo com as recomendações do fabricante. Os tubos com esta mistura foram incubados à temperatura ambiente para a estabilização da atividade transcricional e a conservação da integridade do RNA. Depois, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados bacterianos estabilizados foram armazenados em freezer -80°C até o procedimento de extração do RNA total.

3. 7. 2 Extração de RNA total

As bactérias estabilizadas com “RNAprotect® Bacteria Reagent” foram submetidas à extração de RNA total com “RNeasy® Mini Kit”, sendo seguidas as recomendações do fabricante com adaptações nos procedimentos. Após descongelamento em gelo, os precipitados bacterianos (item 3.7.1) foram ressuspensos em 500 µL de “RLT buffer” (Qiagen™) e transferidos para tubos de 2 mL parcialmente preenchidos por microesferas de vidro de 1 mm de diâmetro (Bertin Technologies). A lise mecânica das células foi feita no homogeneizador “Precellys 24” configurado para agitar os tubos a 6.500 rpm por 2 ciclos de 15 s, com intervalo de 5 s. As amostras foram centrifugadas por 1 min e o sobrenadante foi

transferido para as colunas “RNeasy Mini spin column”. As colunas foram submetidas aos processos descritos no manual do “RNeasy® Mini Kit”. Quando indicado, foram acrescentados a cada coluna 130 µL de solução “DNase I incubation Mix”, para a eliminação de DNA genômico residual. A eluição do RNA total retido na membrana das colunas foi feita duas vezes com 30 µL de água mili-Q RNase-Free. Após a eluição do RNA, as amostras foram tratadas novamente com “DNase I incubation Mix” a temperatura ambiente por 10 min e depois purificadas com uso do kit “RNeasy® MinElute® Cleanup”. As alíquotas de RNA total obtidas foram quantificadas em equipamento “NanoDrop 1000” e as amostras foram armazenadas a -80°C até sua utilização.

3. 7. 3 Síntese de cDNA

As amostras de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa na qual foi empregado o *kit* “High Capacity cDNA Master Mix”, segundo as recomendações do fabricante. Para a realização destas reações foram utilizadas as mesmas quantidades de RNA total das alíquotas provenientes das condições controle e estresse de cada réplica biológica. Os cDNAs gerados foram mantidos a -20°C até a sua utilização.

3. 7. 4 RT- PCR

Amostras de cDNA obtidas através da técnica de transcrição reversa foram submetidas a reações de PCR utilizando diferentes combinações de iniciadores (Tabela 3). Como controle negativo, as amostras de RNA extraídas não submetidas à reação de transcrição reversa foram incluídas nas reações de PCR utilizando-se os mesmos iniciadores. Como controle positivo do experimento foi utilizada uma amostra de DNA genômico extraída da linhagem 1002. Os produtos das reações de PCR foram resolvidos através de eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio, para confirmar a presença de bandas de *amplicon* de tamanho correspondente ao esperado para cada par de iniciadores (Tabela 3). Os sítios de anelamento podem ser visualizados ao longo das sequências gênicas de *sigE*, *cseE* e *tatB* na Figura 4.

Tabela 3. Combinações de iniciadores utilizados no ensaio de RT-PCR e o tamanho do *amplicon* esperado.

Pares de iniciadores	Tamanho do <i>amplicon</i>
sigE 1_F GCCTATAACATCGCCAACTTG cseE_R TTGTCTAGGAAGGTTTGTGGG	619 pb
cseE_F CGACTCCGTGGTTCTAGTTG tatB 1_R TTGTATTTCTGGAGTCTGCGG	645 pb
sigE 1_F GCCTATAACATCGCCAACTTG tatB 1_R TTGTATTTCTGGAGTCTGCGG	1127 pb
sigE 2_F GCGGCGACTAATGAAGAC tatB 2_R CAGCACTAGGAGAGTGATGATC	572 pb

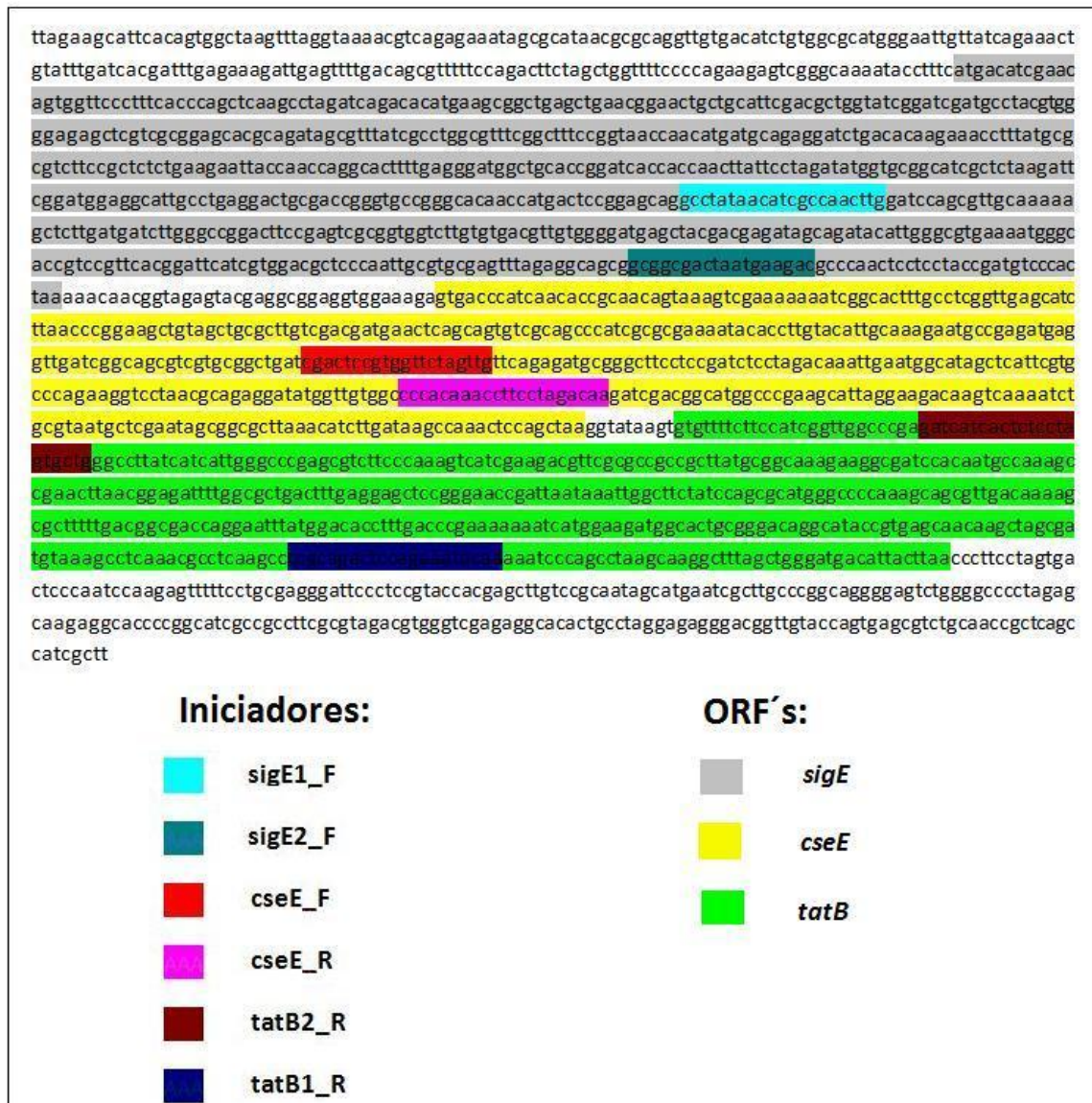


Figura 4. Representação dos sítios de anelamento dos iniciadores, utilizados nas reações de RT-PCR, nas ORF's no loci gênico de *sigE*, *cseE* e *tatB*.

3. 7. 5 RT-qPCR (PCR quantitativa)

Foram realizadas 3 réplicas biológicas, para o estresse nitrosativo e também para o ácido, da reação de qPCR contendo tanto os oligonucleotídeos iniciadores para o gene escolhido como normalizador, gene *16s rDNA*, quanto para os genes de interesse da linhagens tipo-selvagem 1002, listados na tabela 6, de acordo com os parâmetros

representados nas tabelas 4 e 5. Foi empregado o *kit* “Power SYBR® Green PCR Master Mix”.

3. 7. 5. 1 Seleção de controle endógeno de normalização para qPCR

Foram realizadas várias réplicas técnicas de reações de qPCR contendo os iniciadores para o gene 16s rDNA (Tabela 6), sendo avaliado se os *Cycle threshold's* (Cts) obtidos para os transcritos do gene na condição de estresse se aproximaram daqueles obtidos para a condição controle. Os parâmetros de utilização dos reagentes e de amplificação no termociclador “7900 Real-Time PCR System” estão descritos na Tabela 4 e na Tabela 5, respectivamente.

Tabela 4. Reagentes e suas quantidades utilizadas nas reações de qPCR.

Reagente	Concentração do estoque	Concentração de trabalho	Concentração final na reação	Volume por reação
Master Mix (Applied Biosystems)	2X	2X	1X	7,5 µL
Iniciador senso	100 pmol/ µL	2,5 pmol/ µL	2,5 pmol/ µL	1,0 µL
Iniciador anti-senso	100 pmol/ µL	2,5 pmol/ µL	2,5 pmol/ µL	1,0 µL
Amostra de cDNA	Resultante da transcrição reversa ¹	Estoque diluído 5X	-	1,0 µL (ausente para N.T.C. ²)
H ₂ O mili-Q estéril	-	-	-	q.s.p. 15 µL

¹. Entre cada réplica biológica foi empregado uma quantidade diferente de RNA total na reação de transcrição reversa

². Reações N.T.C. serão realizadas para verificação de ausência de amplificação quando a amostra de cDNA é substituída por água Mili-Q estéril.

Tabela 5. Parâmetros selecionados no termociclador para o processamento das reações de qPCR.

Etapa da reação de qPCR	Subetapa da reação de qPCR	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	-	95 °C	10 min
Estágio cíclico (45 repetições)	Desnaturação	95 °C	15 s
	Anelamento e extensão de iniciadores	60 °C	1 min
Análise de dissociação contínua ¹	Desnaturação	95 °C	15 s
	Renaturação	60 °C	1 min
	Desnaturação	95°C	30 s

¹ A etapa de análise de dissociação contínua foi realizada para confirmação da presença de produtos amplificados específicos nas reações de qPCR

3. 7. 5. 2 Confeção de oligonucleotídeos iniciadores

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores foi baseado nas sequências específicas de DNA codificante dos genes alvos deste trabalho. Para a confecção dos iniciadores, realizada com emprego do *software* “PrimerQuest” (IDT SciTools), foram considerados como critérios de seleção a temperatura de anelamento dos pares de bases em torno de 60°C e o tamanho variável entre 50 e 150 pb para as sequencias-alvo amplificadas (*amplicon*). Os iniciadores selecionados (Tabela 6) foram ainda analisados com auxílio da ferramenta “Oligo Analyzer v3.1” (IDT SciTools) quanto às probabilidades de formação de grampos, homodímeros e heterodímeros, que são estruturas que podem prejudicar a eficiência de amplificação durante as reações de qPCR

Tabela 6: Iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.

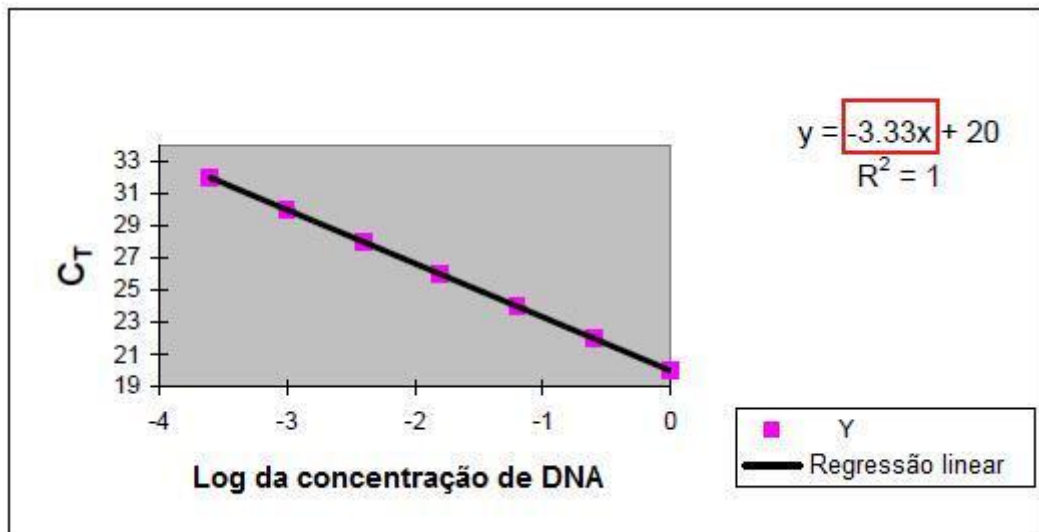
Alvo	Iniciador (5'-3')
16s	Rt_16S_F: CAGCTCGTGTCGTGAGATGT
	Rt_16S_R: CTCTCATGAGTCCCCACCAT
sigE	RT_sigE_F: GCCTATAACATCGCCAATTG
	RT_sigE_R: CCCAATGTATCTGCTATCTCGTC
cseE	RT_cseE_F: CGACTCCGTGGTTCTAGTTG
	RT_cseE_R: TTGTCTAGGAAGGTTTGTGGG
tatB	RT_tatB_F: ACGGCGACCAGGAATTTATG
	RT_tatB_R: TTGTATTTCTGGAGTCTGCGG

3. 7. 5. 3 Determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores

Para se realizar uma quantificação relativa, é essencial que o gene alvo tenha uma eficiência de amplificação próxima à do controle endógeno (100% +/- 10%). A validação da eficiência de amplificação das reações de qPCR é realizada através da construção de uma curva padrão. Esta é obtida realizando-se diluições seriadas das amostras de cDNA e é representada graficamente (Figura 5) como uma regressão linear semi-log de valores de Ct *versus* log da concentração de cDNA. A eficiência de amplificação para cada par de iniciadores pode ser estimada a partir do valor da inclinação da reta (*slope*). O valor de *slope* -3,32 indica uma eficiência de amplificação de 100%, enquanto valores menores que este indicam uma eficiência menor que 100% e valores maiores indicam uma eficiência maior que 100% (Applied Biosystems, 2012).

A eficiência de amplificação para os iniciadores do gene 16s foi validada previamente por Castro (2009). Os valores de eficiência para os outros 3 pares de iniciadores utilizados (Tabela 6) foram estimados por este trabalho a partir da preparação

de reações de qPCR contendo cDNA submetido a diluições seriadas de 2 vezes. Basicamente, as reações foram realizadas como descrito no item 3.7.5.1, sendo preparadas 3 réplicas técnicas para cada ponto de diluição da amostra de cDNA, para um mesmo par de iniciadores. Os Cts obtidos para cada diluição foram submetidos à regressão linear, e foram calculados os valores de *slope* com o emprego do *software* SDS v2.4 (Applied Biosystems™). A partir do valor de *slope* obtido para cada par de iniciadores foi possível calcular a eficiência de amplificação utilizando a equação $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$. (Applied Biosystems, 2012).



Adaptado: Applied Biosystems, 2012.

Figura 5. Curva padrão de uma reação de qPCR representando uma eficiência de amplificação de 100%. O valor de *slope* está marcado em vermelho.

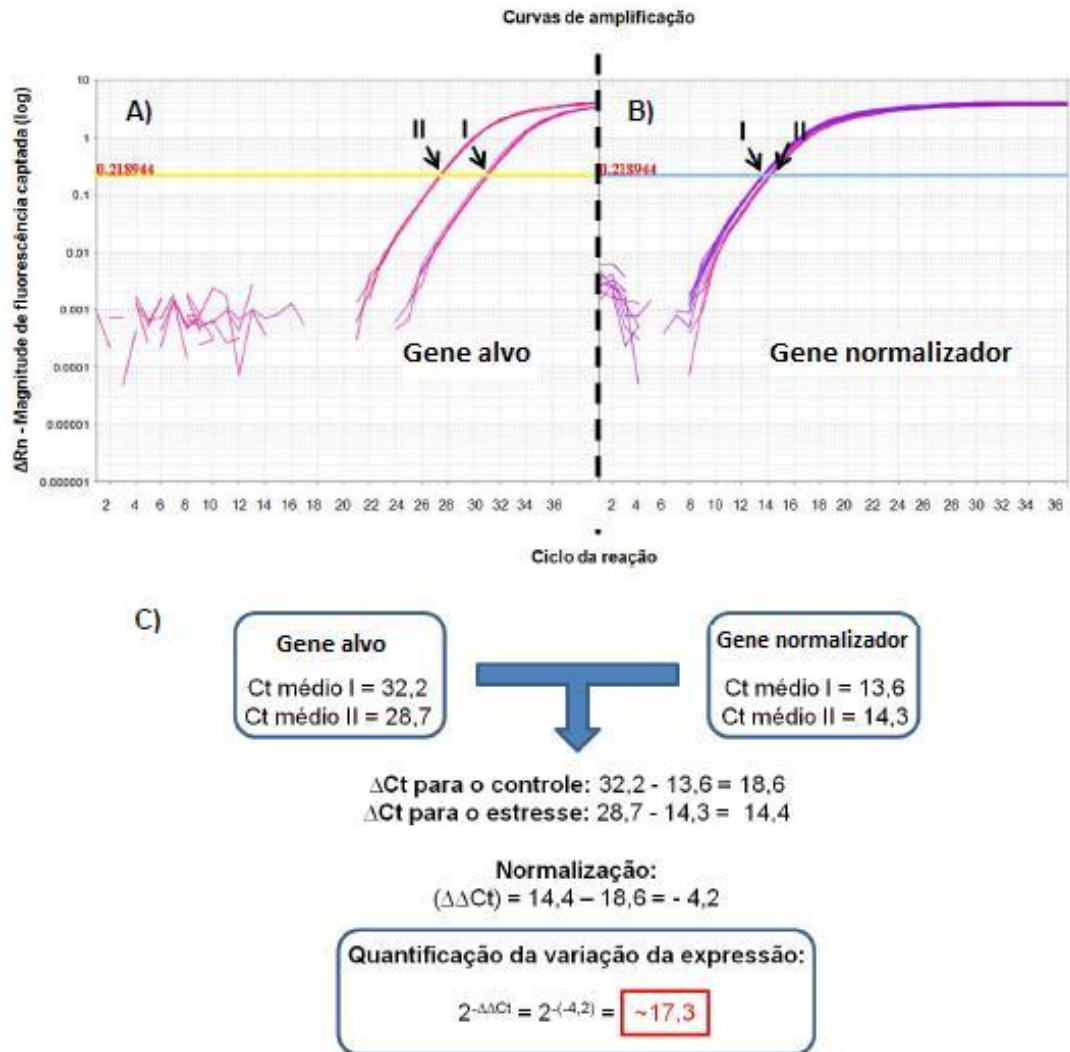
3. 7. 5. 4 Validação da ausência de DNA genômico

Após as reações de transcrição reversa (item 3.7.3.) é importante que todo o DNA presente nas amostras seja correspondente ao DNA complementar gerado. Para validar se a remoção de DNA genômico durante o processo de extração foi eficiente, alíquotas de

todas as amostras de RNA foram submetidas à amplificação por qPCR utilizando os mesmos parâmetros.

3. 7. 5. 5 Reações para quantificação relativa e análise de expressão diferencial

Cada amostra de cDNA foi submetida a 4 réplicas técnicas de reações de qPCR correspondentes a cada par de iniciadores utilizado (Tabela 6). As curvas de amplificação (ΔRn versus Ciclo), plotadas em tempo real pelo *software* SDS v2.4 (Applied Biosystems™) durante o processamento das reações no termociclador “7900 Real-Time PCR System”, foram utilizadas como parâmetros para a definição do limiar de detecção dos produtos amplificados. Este limiar foi configurado para cruzar a fase exponencial logarítmica das curvas de amplificação, etapa em que a fluorescência detectada é resultado do acúmulo de produtos amplificados, acima dos níveis de fluorescência de fundo. Os resultados brutos obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção. Da média dos Cts obtidos para o gene-alvo, relativa a uma determinada condição de estresse, foi subtraída a média calculada para os Cts do gene 16s rDNA, referente à mesma condição de estresse (Figura 6a e b). O valor gerado, denominado ΔCt , representa a normalização das amplificações do gene-alvo em relação às amplificações do gene de controle endógeno selecionado. O mesmo procedimento de normalização foi adotado para o gene-alvo em relação à condição não tratada (controle do estresse). A diferença entre o valor de ΔCt para a condição de estresse e o valor de ΔCt para a condição controle (chamada $\Delta\Delta Ct$) foi calculada e utilizada para a determinação da potência $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Figura 6c). Este valor representa o quanto a transcrição do gene de interesse foi alterada pelo estresse induzido. A significância das alterações detectadas foi avaliada com o emprego do *software* REST 2009 v2.013 (Qiagen).



Adaptado: Castro, 2009.

Figura 6. Representação esquemática da normalização do nível de expressão do gene alvo pela utilização de um gene normalizador através do método $\Delta\Delta Ct$. A) Amplificações para o gene alvo. A seta I corresponde a média dos valores de Cts para a condição controle, enquanto II indica a média dos valores de Cts para a condição de estresse. B) Amplificações para o gene normalizador. O Ct médio I corresponde à condição controle, enquanto o Ct médio da condição de estresse está representado por II. C) Os valores de Ct são normalizados pelo cálculo da diferença entre os Cts do gene de alvo e os Cts do gene normalizador, para uma determinada condição (ΔCt). A diferença calculada para a condição de estresse é então subtraída da diferença calculada para a condição controle ($\Delta\Delta Ct$). A expressão do gene alvo, após o tratamento, aumentou cerca de 17 vezes em relação à condição controle, conforme calculado pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3. 7. 5. 6 Análise da especificidade das reações de qPCR

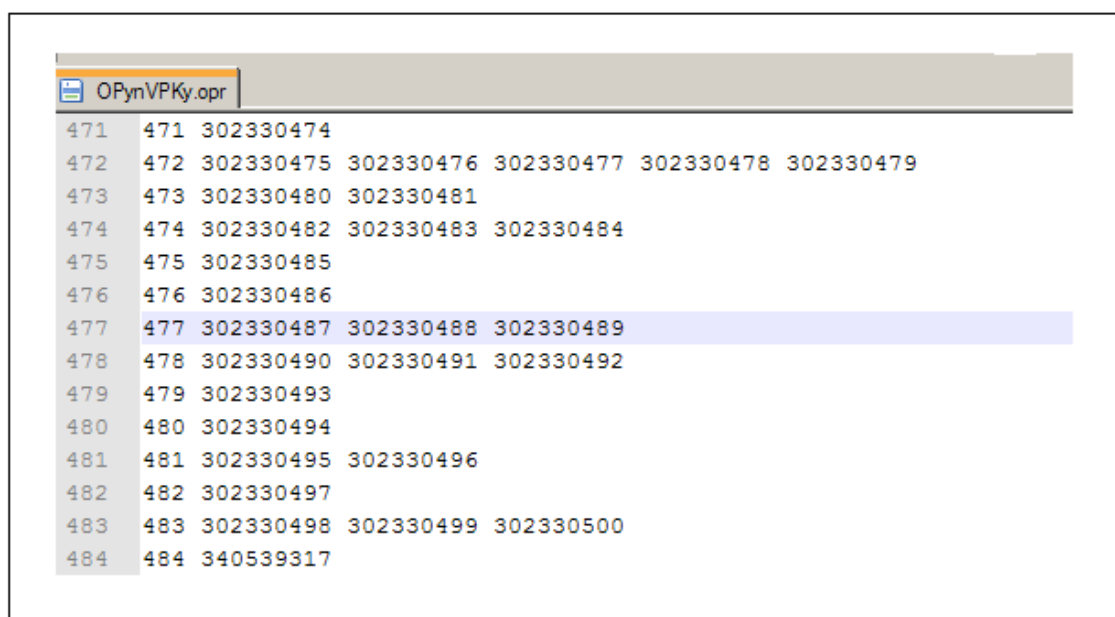
O termociclador “7900 Real-Time PCR System” foi configurado para elevar a temperatura das amostras até 95°C, após as etapas de amplificação de cDNA (Tabela 5). Durante este processo, as variações na emissão de fluorescência, em decorrência da liberação de Sybr Green I das cadeias duplas de DNA amplificado, foram detectadas e analisadas pelo *software* SDS v2.4 (Applied Biosystems™). Os dados gerados permitiram avaliar a temperatura média de desibridização das moléculas de DNA (T_m), parâmetro utilizado para a constatação da presença de fragmentos de tamanho específico.

4. RESULTADOS

4. 1 Identificação e caracterização *in silico* das unidades transcricionais dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB*.

4. 1. 1 Predição de *operon* pela ferramenta DOOR v2.0

Conforme descrito no item 3.4, a sequência de DNA genômico da linhagem 1002 foi submetida à predição *in silico* de *operons* pela ferramenta DOOR v2.0. O relatório da análise realizada, protocolado pelo servidor do site http://csbl1.bmb.uga.edu/OperonDB_10142009/DOOR.php com a identidade de documento (ID) "OPynVPKy", indica que os genes *sigE*, *tatB* e *cseE* constituem um único *operon* na linhagem avaliada (Figura 7).



Line	GI
471	471 302330474
472	472 302330475 302330476 302330477 302330478 302330479
473	473 302330480 302330481
474	474 302330482 302330483 302330484
475	475 302330485
476	476 302330486
477	477 302330487 302330488 302330489
478	478 302330490 302330491 302330492
479	479 302330493
480	480 302330494
481	481 302330495 302330496
482	482 302330497
483	483 302330498 302330499 302330500
484	484 340539317

Figura 7. Visualização da predição de *operons* em *C. pseudotuberculosis* realizada pela ferramenta DOOR v2.0. Os números identificadores GI (*genInfo identifier*) ordenados em uma mesma linha indicam a disposição de seus respectivos genes em um único *operon*. Os GI's 302330487 302330488 302330489 dispostos na linha 477 destacada em azul correspondem aos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* respectivamente. Os arquivos gerados pela análise do servidor não contêm informações sobre valores de *score* para genomas não depositados na base de dados.

Análises baseadas em sequências previamente depositadas no banco de dados do DOOR v2.0, referentes a diferentes espécies do grupo CMNR, revelam que os genes homólogos aos *sigE*, *cseE* e *tatB* de *C. pseudotuberculosis* também se encontram em *operons* nos genomas desses microrganismos (Tabela 7). Dentre as espécies do gênero *Corynebacterium* as patogênicas *C. diphtheriae* e *C. urealyticum* apresentam genomas com disposição para os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* idêntica ao que foi observado para *C. pseudotuberculosis*.

Tabela 7. Predição de operons para os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* das espécies do grupo CMNR com sequências depositadas na base de dados do DOOR v2.0.

Espécies	Tamanho do operon (Nº de genes)	Genes	Similaridade com o respectivo gene homólogo de <i>C. pseudotuberculosis</i>¹
<i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129	3	<i>sigE</i>	89%
		<i>cseE</i>	66%
		<i>tatB</i>	74%
<i>C. urealyticum</i> DSM 7109	3	<i>sigE</i>	73%
		<i>cseE</i>	62%
		<i>tatB</i>	47%
<i>C. efficiens</i> Y-S 314	2	<i>cseE</i>	47%
		<i>tatB</i>	47%
<i>C. glutamicum</i> R	2	<i>cseE</i>	44%
		<i>tatB</i>	50%
<i>C. jeikeium</i> 411	2	<i>tatB</i>	45%
		<i>cseE</i>	46%
<i>N. farcinica</i> IFM 10152	4	<i>sigE</i>	74%
		<i>cseE</i>	48%
		<i>hrtA</i> ²	-
		<i>tatB</i>	37%
<i>M. tuberculosis</i> CDC 1551	2	<i>sigE</i>	68%
		<i>cseE</i>	45%
<i>M. tuberculosis</i> F11	2	<i>sigE</i>	68%

		cseE	45%
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	2	sigE	68%
		cseE	45%
<i>M. tuberculosis</i> KZN 1435	2	cseE	45%
		sigE	68%
<i>R. opacus</i> B4	2	sigE	65%
		cseE	45%
<i>R. jostii</i> RHA1	2	sigE	66%
		cseE	45%

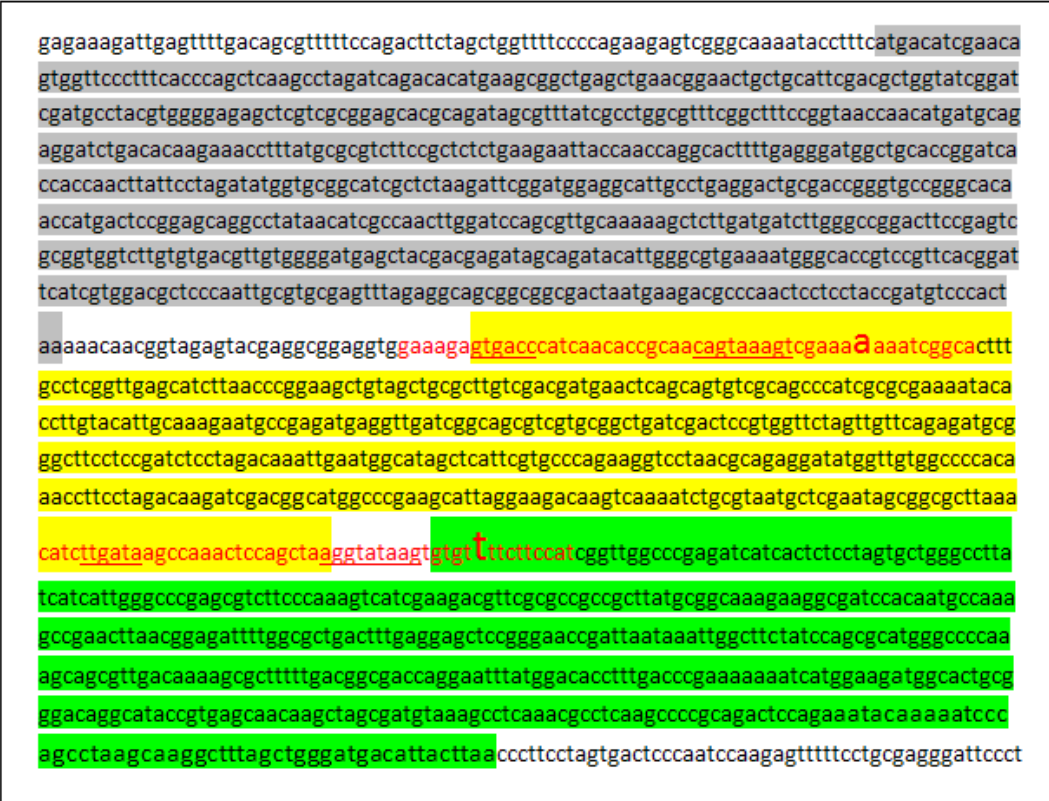
¹Valor de identidade máxima, avaliada pela ferramenta de alinhamento BLASTp (NCBI), em relação ao gene homólogo de *C. pseudotuberculosis*.

² Este gene (GI: 54026705) não está localizado no mesmo operon que sigE, cseE ou tatB em *C. pseudotuberculosis*.

4. 1. 2 Identificação de promotores e sítios de término de transcrição

Conforme a metodologia descrita no item 3.4, foram identificadas diversas sequências consenso de promotores reconhecidos por fatores de transcrição de *E. coli* e *B. subtilis*. Foram identificados ao todo 2 promotores: o primeiro localizado internamente no início da ORF do gene *cseE* e o segundo, também interno, no final da ORF de *cseE* a montante do gene *tatB*. Na figura 8 estão indicados os promotores preditos ao longo das sequências gênicas e intergênicas de *sigE*, *cseE* e *tatB*.

Análises *in silico* envolvendo esta mesma região do genoma de *C. pseudotuberculosis* permitiram a predição de 3 sítios de terminação da transcrição gênica, rho-independentes, cada um identificado por uma ferramenta diferente (Figura9). Dois destes sítios se localizam internamente, o primeiro no meio e o segundo no final da ORF de *tatB*; e o terceiro sítio se localiza a 104 pb a jusante deste gene (figuras 9 e 10).




```

aaacccttctagacaagatcgacggcatggcccgaagcatttaggaaagacaagtcasaatctgcgtaatgctcgaatagcggcgcttaa
acatcttgataagccaaaactccagctaagggtataagtggttttcttccatcggttggcccagatcatcactctcctagtgctgggcctta
tcatcattgggcccagcgtcttccaaaagtcacgaagacgcttcgcccgcgcttatgctggcaagaaggcgatccacaatgccaaa
gccgaacttaacggagattttggcgctgactttgaggagctccgggaaccgattaataaattggcttctatccagcgcatggccccaa
agcagcgttgacaaaagcgtttttgacgggaccaggaatttatggacaccttgacccgaaaaaaatcatggaagatggcact
gctgggacaggcataccgtgagcaacaagctagcggatgtaaagcctcaaacgcctcaagccccgcagactccagaatacaaaaat
cccagcctaagcaaggcttagctgggatgacattacttaacccttctagtactcccaatccaagatcttctcgcgaggatt
ccctcgtaccacgagcttgcgcaatagcatgaatcgcttcccggcaggggagctggggccctagagcaagaggcacccc
ggcatcgcggcccttcgctgtagacgtgggtcgagaggcacactgcctaggagaggacggttgaccagtgagcgtctgcaaccgctc

```

Figura 9. Localização dos sítios de terminação rho-independentes identificados. A sequência de bases nitrogenadas marcadas em verde representa a ORF do gene *tatB*. Cada sequência de caracteres vermelhos representa o sítio de terminação da transcrição predito por cada ferramenta utilizada (ARNold, FindTerm e WebGeSTer). Os caracteres realçados em azul constituem sequências palindrômicas presentes nos sítios de terminação.

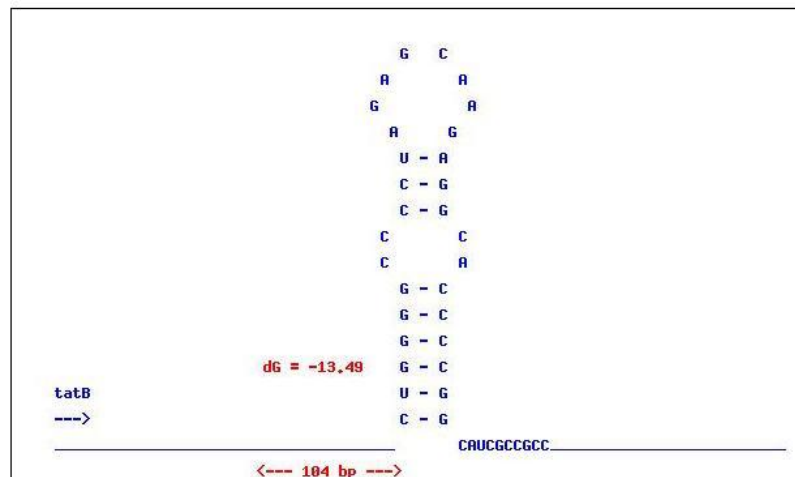


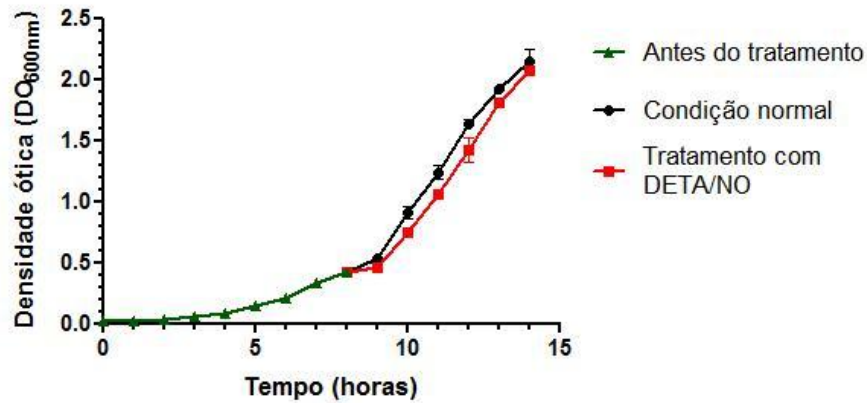
Figura 10. Exemplo de visualização de sítio de terminação predito pela ferramenta WebGeSTer.

4. 2 Susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* aos estresses nitrosativo e ácido.

4. 2. 1 Efeito causado pela adição de DETA/NO na cultura bacteriana

Foi avaliado o efeito do estresse gerado pelo NO sobre o crescimento de *C. pseudotuberculosis* 1002, de acordo com a metodologia descrita no item 3.6. A curva de crescimento pode ser visualizada na figura 11. Os valores aferidos de DO_{600nm} indicaram redução nas taxas de crescimento por pelo menos 2h após adição de DETA/NO do estresse na cultura bacteriana (DO_{600nm}≈0,4), em comparação com a cultura controle. O índice de crescimento percentual calculado para a cultura tratada, em relação à cultura controle, foi de aproximadamente 90%, indicando uma redução de crescimento em torno de 10%, ao ser induzido o estresse nitrosativo. Porém, para os tempos de 3h e 6h após a exposição ao estresse, as contagens de unidades formadoras de colônia em placas de petri não revelaram alteração significativa na viabilidade celular da cultura tratada em relação ao controle.

A



B

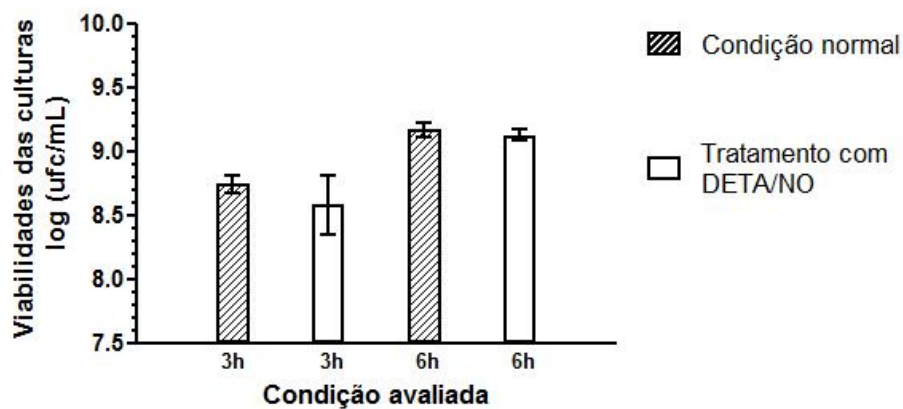
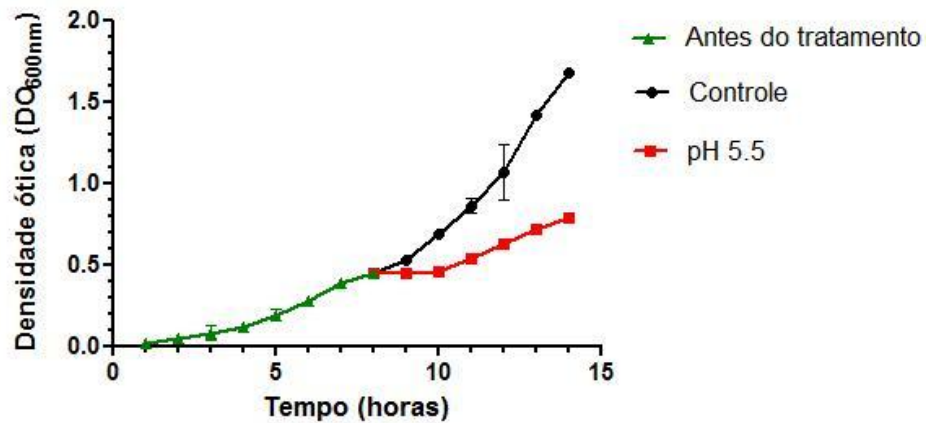


Figura 11. Efeito do estresse nitrosativo sobre o crescimento de *C. pseudotuberculosis* 1002. (A) Representação gráfica das densidades óticas (600 nm) da cultura controle e da cultura submetida a 100uM de DETA/NO, ao longo de 14h de monitoramento. (B) Viabilidade celular da cultura controle e da cultura submetida a estresse nitrosativo (100uM de DETA/NO), estimada por meio de plaqueamentos e contagens de ufc 3 e 6h após a indução do estresse.

4. 2. 2 Efeito causado pela adição de meio ácido na cultura bacteriana

Os efeitos do estresse ácido (pH 5.5) sobre o crescimento da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* foram estimados como descrito no item 3.6. Os valores de densidade ótica aferidos para as culturas controle e tratada (Figura 12) indicaram redução das taxas de crescimento na condição de acidez por pelo menos 6h de exposição. O índice de crescimento percentual calculado para a cultura tratada em relação ao controle foi de aproximadamente 60%, indicando redução de crescimento em torno de 40% quando na condição de acidez. E através da contagem de unidades formadoras de colônia para os tempos de 3h e 6h após a exposição ao estresse, foi possível observar alteração significativa na viabilidade celular da cultura tratada em relação ao controle.

A



B

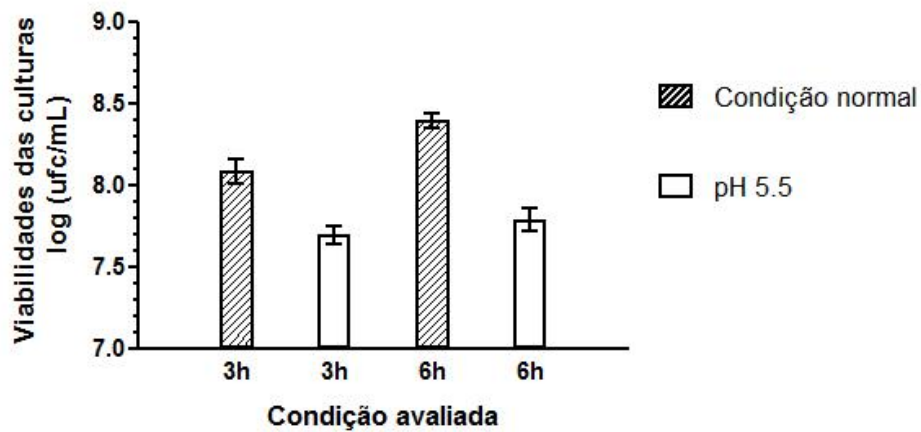


Figura 12. Efeito do estresse ácido sobre o crescimento de *C. pseudotuberculosis* 1002. (A) Representação gráfica das densidades óticas (600 nm) das culturas controle e submetida ao estresse ácido (pH 5.5), durante 14h de monitoramento. (B) Viabilidade celular da cultura controle e da cultura tratada estimada por meio de plaqueamentos e contagens de ufc 3 e 6h após a indução do estresse ácido.

4.3 Análises transcricionais

4.3.1 RNA total obtido e transcrição reversa

Quantidades suficientes de RNA total de *C. pseudotuberculosis* 1002, extraídas como descrito no item 3.7.2, foram obtidas para as reações de transcrição reversa. As concentrações observadas para as diferentes amostras (controles e tratamentos) e suas respectivas réplicas biológicas estão dispostas na tabela 8, assim como as quantidades que foram empregadas para a obtenção de cDNA.

Tabela 8. Concentrações de RNA total das amostras extraídas e quantidades empregadas nas reações de transcrição reversa.

Condição avaliada	Réplica biológica	Concentração de RNA ng/uL		Quantidade de RNA empregada na RT (vf = 20 uL)
		Amostras controles	Amostras tratadas	
DETA/NO (100uM)	I	8,8	11,1	140,0 ng
	II	8,6	3,3	52,8 ng
	III	2,6	5,0	41,6
Ácido (pH 5.5)	I	4,6	13,0	73,6 ng
	II	17,5	5,5	88,0 ng
	III	4,2	2,3	36,8

4. 3. 2 Avaliação da unidade transcricional por RT-PCR

Através da técnica de RT-PCR, conforme a metodologia descrita no item 3.7.4, foi possível amplificar bandas do tamanho esperado para os pares de iniciadores sigE1_F + cseE_R e cseE_F + tatB1_R , confirmando a transcrição conjunta dos genes *sigE* e *cseE*, assim como também de *cseE* e *tatB* (Figura 13A). Entretanto, não ocorreu amplificação de cDNA quando o par de iniciador sigE1_F + tatB1_R foi utilizado. Para confirmar a transcrição conjunta de *sigE*, *cseE* e *tatB* foi necessário a confecção e utilização de um novo par de iniciadores (sigE2_F + tatB2_R), que amplificasse um fragmento de cDNA menor (Figura 13B). Dessa forma foi confirmado experimentalmente que os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* estão presentes em uma mesma molécula de cDNA.

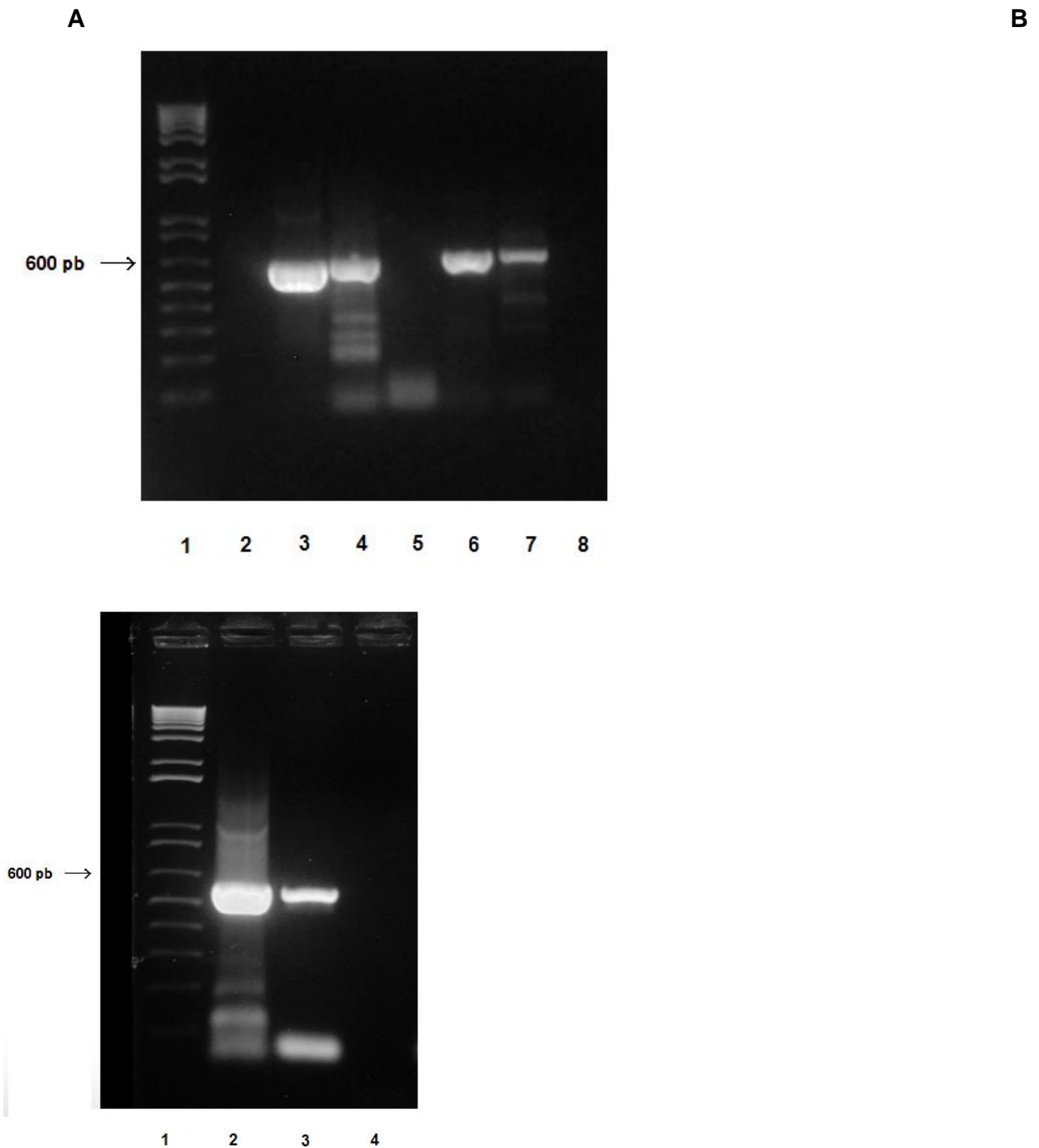


Figura 13. Resolução em gel de agarose 1% dos produtos amplificados através de RT-PCR. (A) Segue a identificação das canaletas. **1)** 1 kb Plus DNA Ladder™; **2)** Controle negativo; **3)** gDNA (controle positivo), *sigE1_F + cseE_R*; **4)** cDNA, *sigE1_F + cseE_R*; **5)** RNA, *sigE1_F + cseE_R*; **6)** gDNA, *cseE_F + tatB1_R*; **7)** cDNA, *cseE_F + tatB1_R*; **8)** RNA, *cseE_F + tatB1_R*. (B) Segue a identificação das canaletas. **1)** 1 kb Plus DNA Ladder™; **2)** gDNA, *sigE2_F + tatB2_R*; **3)** cDNA, *sigE2_F + tatB2_R*; **4)** RNA, *sigE2_F + tatB2_R*.

4. 3. 3 Reações de PCR quantitativa

4. 3. 3. 1 Eficiências de amplificação os iniciadores

A eficiência de amplificação para cada par de iniciadores utilizados nas reações de qPCR foi determinada conforme descrito no item 3.7.5.3. Nas figuras 14 e 15 são mostrados dados relativos às curvas padrão das reações de qPCR utilizando os iniciadores complementares às sequência dos genes alvos deste trabalho, *sigE*, *cseE* e *tatB*. A partir dos valores de *slope* obtidos pela regressão linear dos Cts observados foram calculadas as seguintes eficiências de amplificação para os genes *sigE*, *cseE* e *tatB*: 95,9%, 103,19% e 109,66%, respectivamente. Estes valores de eficiência são considerados aceitáveis e permitiram a validação dos ensaios de quantificação relativa deste trabalho.

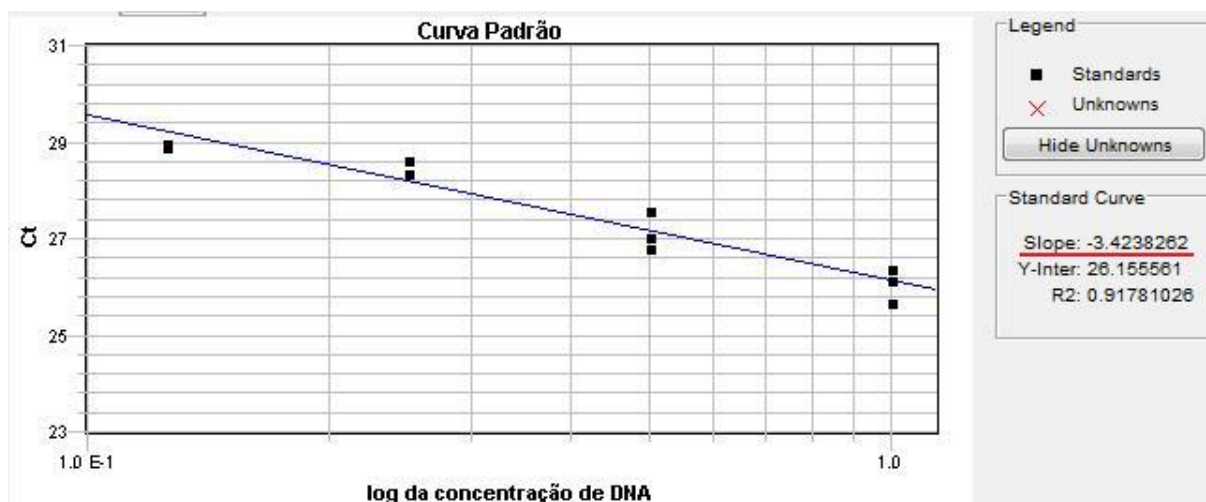


Figura 14. Regressão linear dos valores de Cts referentes ao gene *sigE*. O valor de *slope* está destacado em vermelho. Imagem gerada pelo software SDS 2.4.

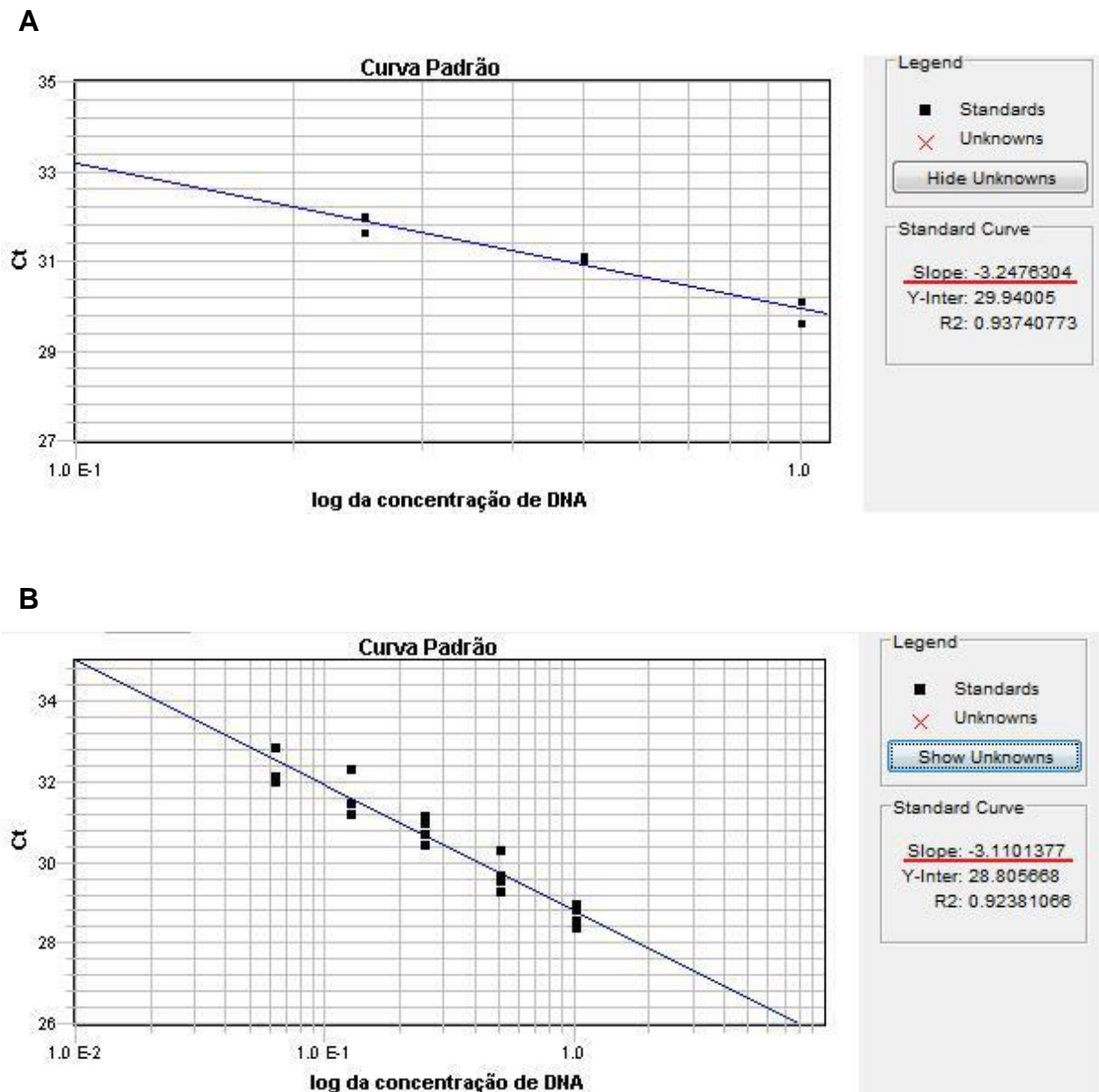


Figura 15. Regressão linear dos valores de C_t s referentes aos genes *cseE* e *tatB*. Em (B) e (C) são mostrados os valores de *slope* da curva padrão dos genes *cseE* e *tatB* respectivamente. O valor de *slope* está destacado em vermelho. Imagem gerada pelo software SDS 2.4.

4. 3. 3. 2 Especificidade das reações de qPCR através de curvas de dissociação

Curvas de dissociação contínua foram plotadas para todas as reações de qPCR, como descrito no item 3.7.5.6. Todas as curvas obtidas para um mesmo par de iniciadores (tabela 6) apresentaram picos máximos de fluorescência com valores próximos, relativos à temperatura média de hibridização do produto amplificado (figura 16).

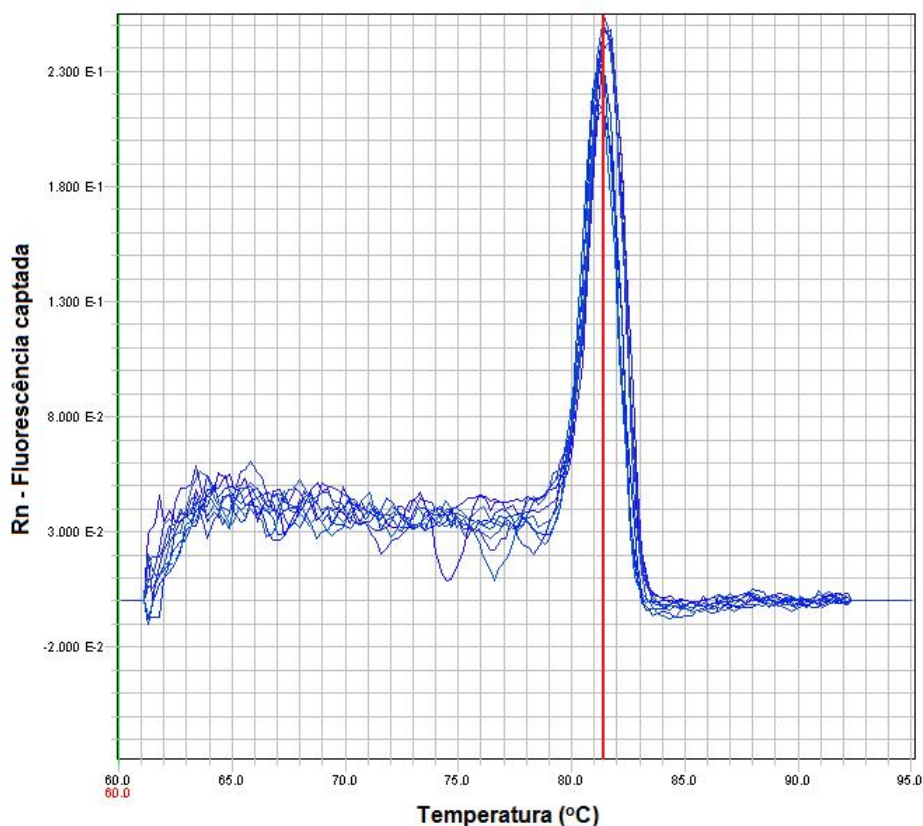


Figura 16. Curvas de dissociação contínua obtidas para os produtos amplificados relativos aos transcritos do gene *sigE*. É possível observar picos de fluorescência aproximados entre as reações, indicando ampliações específicas de fragmentos de cDNA cuja temperatura média de dissociação é 81,3 °C.

4. 3. 3. 3 Confirmação da ausência de DNA genômico

A validação de ausência de DNA genômico nas amostras de RNA foi avaliada conforme a metodologia contida no item 3.7.5.4. Não foram detectadas curvas de amplificações nas reações de qPCR utilizando os pares de iniciadores para os genes alvos deste trabalho, confirmando a ausência de contaminação por DNA genômico (figura 17).

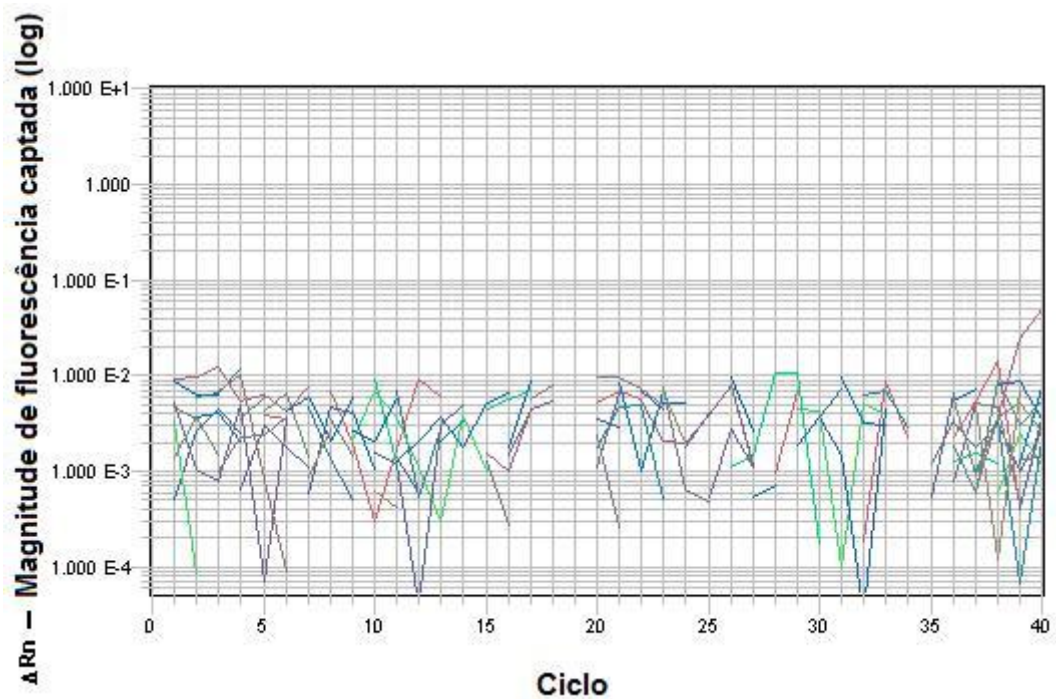


Figura 17. Ausência de amplificação por qPCR dos produtos de RNA extraídos de *C. pseudotuberculosis* 1002. Reações de qPCR foram realizadas utilizando iniciadores para todos os genes avaliados neste trabalho (tabela 6) e RNA extraído de todas as condições testadas. É possível observar apenas a fluorescência de fundo.

4. 3. 3. 4 Expressão gênica diferencial em resposta ao estresse nitrosativo

Três réplicas biológicas de qPCR foram realizadas para as amostras de culturas controles e submetidas ao estresse nitrosativo, utilizando os iniciadores citados na Tabela 6.

Para cada experimento, foram calculadas as médias para os valores de Cts obtidos em cada conjunto de réplicas técnicas de reações (condições controle e estresse), sendo então estimadas as diferenças (ΔC_t) entre a média de Cts para o gene alvo (*sigE*, *cseE* e *tatB*) e a média de Cts para o gene 16s rDNA (Tabela 9) .

Tabela 9. Valores de ΔC_t calculados para a normalização dos Cts obtidos para as ampliações por qPCR, relativos ao estresse induzido pelo DETA/NO.

Valores médios de ΔC_t em relação gene 16s rDNA						
Gene alvo	Experimento I		Experimento II		Experimento III	
	Controle	DETA/NO	Controle	DETA/NO	Controle	DETA/NO
<i>sigE</i>	14,27 \pm 0,10	14,04 \pm 0,07	12,80 \pm 0,24	11,59 \pm 0,51	12,06 \pm 0,35	9,98 \pm 0,46
<i>cseE</i>	12,55 \pm 0,06	12,49 \pm 0,09	10,93 \pm 0,14	9,49 \pm 0,09	10,55 \pm 0,29	8,27 \pm 0,40
<i>tatB</i>	13,03 \pm 0,07	13,20 \pm 0,07	12,01 \pm 0,14	10,85 \pm 0,20	11,48 \pm 0,27	8,99 \pm 0,20

Em seguida foram então estimadas, para cada gene alvo as diferenças ($\Delta\Delta C_t$) entre os valores de ΔC_t do estresse e os valores de ΔC_t do controle. Os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, correspondentes ao número de vezes em que a transcrição de um dado gene aumentou ou diminuiu na condição de estresse (tratamento) em relação à condição controle são exibidos na tabela 10 e representados graficamente na figura 18. No experimento I, somente o gene *sigE* teve sua expressão aumentada significativamente na condição de estresse nitrosativo em relação ao controle. Nos experimentos II e III, todos os genes foram regulados positivamente na condição de estresse com diferença significativa em relação aos controles.

Tabela 10. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculados para cada gene após a exposição a 100 μ M de DETA/NO.

Experimento	Gene	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Expressão relativa	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p (Bootstrap)
I	<i>sigE</i>	1,177 *	1,022 - 1,337	0,018
	<i>cseE</i>	1,042	0,895 - 1,223	0,456
	<i>tatB</i>	0,888	0,745 - 1,065	0,153
II	<i>sigE</i>	2,315 *	1,393 - 4,357	0,014
	<i>cseE</i>	2,697 *	2,230 - 3,205	0,009
	<i>tatB</i>	2,232 *	1,908 - 2,891	0,007
III	<i>sigE</i>	4,233 *	2,147 - 8,182	0,015
	<i>cseE</i>	4,874 *	3,015 - 8,752	0,007
	<i>tatB</i>	5,625 *	4,122 - 8,479	0,003

* Genes regulados positivamente (*up-regulation*) com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (método Bootstrap $p < 0,05$).

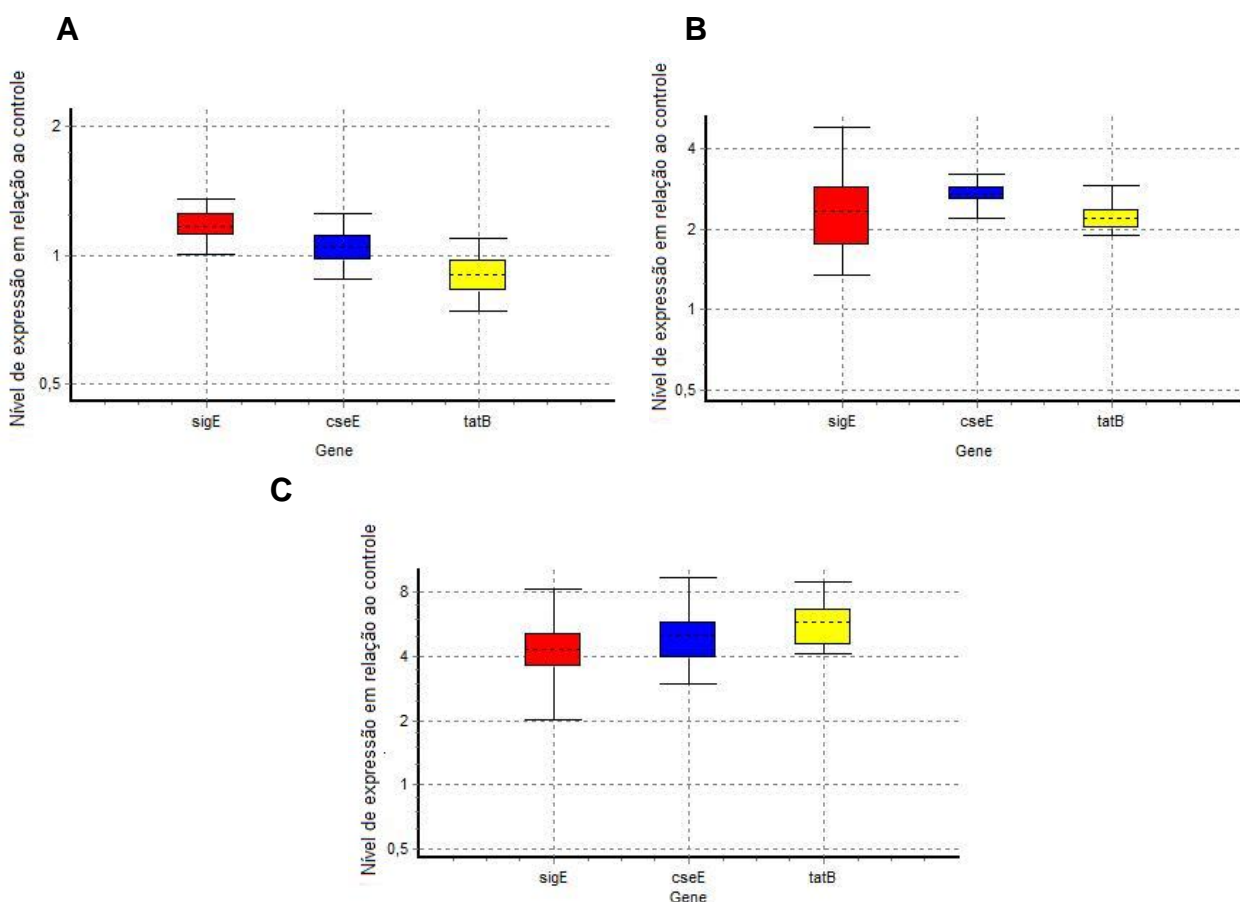


Figura 18. Representação gráfica do nível de expressão dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* na condição estresse nitrosativo em relação ao controle. (A), (B) e (C) correspondem aos experimentos I, II, e III respectivamente.

4. 3. 3. 5 Expressão diferencial em resposta ao estresse ácido

Três réplicas biológicas de qPCR foram realizadas para as amostras de culturas controles e submetidas ao estresse ácido utilizando os iniciadores citados na Tabela 6.

Para cada experimento foram calculadas as médias para os valores de Cts obtidos em cada conjunto de réplicas técnicas de reações (condições controle e estresse), sendo então estimadas as diferenças (ΔC_t) entre a média de Cts para o gene alvo (*sigE*, *cseE* e *tatB*) e a média de Cts para o gene 16s rDNA (tabela 11) .

Tabela 11. Valores de ΔC_t calculados para a normalização dos Cts obtidos para as amplificações por qPCR, relativos ao estresse induzido pela acidez.

Valores médios de ΔC_t em relação gene 16s rDNA						
Gene alvo	Experimento I		Experimento II		Experimento III	
	Controle	pH 5.5	Controle	pH 5.5	Controle	pH 5.5
<i>sigE</i>	13,52 \pm 0,26	12,39 \pm 0,18	11,75 \pm 0,20	10,15 \pm 0,11	13,56 \pm 0,16	10,91 \pm 0,65
<i>cseE</i>	11,63 \pm 0,14	11,09 \pm 0,14	10,65 \pm 0,19	9,62 \pm 0,07	9,54 \pm 0,28	8,60 \pm 0,41
<i>tatB</i>	12,46 \pm 0,33	11,99 \pm 0,12	8,94 \pm 0,60	8,64 \pm 0,19	11,70 \pm 0,33	11,19 \pm 0,33

Foi então estimada a diferença entre o valor de ΔC_t do estresse e ΔC_t do controle ($\Delta\Delta C_t$). Os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculados para cada gene são exibidos na tabela 12 e representados graficamente na figura 19. Nas 3 réplicas biológicas os genes *sigE* e *cseE* foram regulados positivamente com diferença estatística significativa em relação aos controles. O gene *tatB* não apresentou diferença significativa de expressão entre amostras controle e estresse nos 3 experimentos.

Tabela 12. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculados para cada gene após a exposição ao estresse ácido (pH 5.5)

Experimento	Gene	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Expressão relativa	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p(Bootstrap)
I	<i>sigE</i>	2,192 *	1,541 - 3,111	0,004
	<i>cseE</i>	1,448 *	1,119 - 1,861	0,000
	<i>tatB</i>	1,385	0,986 - 2,148	0,057
II	<i>sigE</i>	3,036 *	2,439 - 3,608	0,030
	<i>cseE</i>	2,039 *	1,690 - 2,398	0,000
	<i>tatB</i>	1,235	0,793 - 2,041	0,195
III	<i>sigE</i>	6,267 *	2,885 - 9,557	0,012
	<i>cseE</i>	1,911 *	1,153 - 3,706	0,027
	<i>tatB</i>	1,427	0,980 - 1,972	0,054

* Genes regulados positivamente (*up-regulation*) com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (método Bootstrap $p < 0,05$).

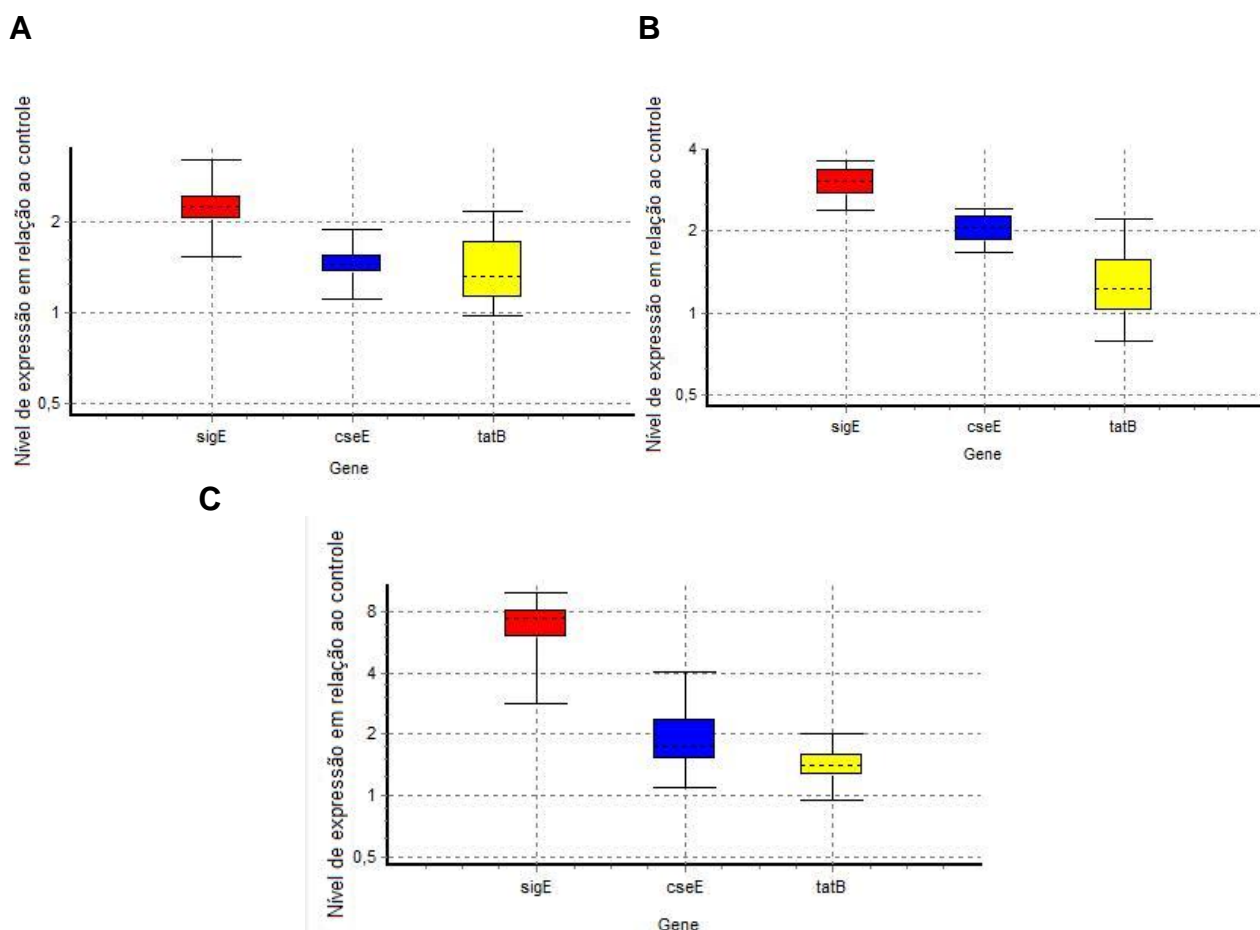


Figura 19. Representação gráfica da taxa de expressão dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* na condição de estresse ácido em relação ao controle. (A), (B) e (C) correspondem aos experimentos I, II, e III respectivamente.

5. DISCUSSÃO

A habilidade de *C. pseudotuberculosis* sobreviver dentro de células fagocíticas é uma característica pouco estudada, apesar do processo patogênico desencadeado pelo microrganismo estar relativamente bem entendido (Dorella *et al.*, 2006a). Em diversos patógenos, os determinantes de virulência estão sob o controle dos ativadores transcricionais que respondem às modificações do ambiente. Em procariotos, a indução da transcrição de genes que respondem ao estresse é alcançada pela ativação de fatores sigma alternativos, os quais interagem com a RNA polimerase para coordenar a expressão gênica, garantindo uma resposta rápida e específica às modificações extremas do ambiente (Marles-Wright & Lewis, 2007). Neste contexto, o estudo dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* é necessário para compreender a regulação da expressão gênica envolvida na resposta adaptativa desta bactéria durante o progresso da infecção. O presente trabalho se propôs a avaliar a expressão do gene codificador do fator sigma E em resposta aos estresses nitrosativo e ácido *in vitro* na tentativa de confirmar seu envolvimento na resposta específica a estes tipos de estresses encontrados no ambiente intracelular. Além disso, a possibilidade dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* formarem uma única unidade transcricional levou este trabalho a buscar a confirmação se estes genes estariam organizados em *operon* e tentar inferir as funções dos genes *cseE* e *tatB*.

Através da análise *in silico*, realizada neste trabalho pela ferramenta DOOR v2.0, foi possível inferir que o gene codificador do fator sigma E, *sigE*, se encontra organizado em *operon* juntamente com os genes *cseE* e *tatB* na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*. A consulta à base de dados do DOOR v2.0 revelou que em algumas espécies do grupo CMNR o gene homólogo ao *sigE* de *C. pseudotuberculosis* também se encontra organizado em *operon*. Em especial nas patogênicas *C. diphtheriae* e *C. urealyticum*, o *operon* predito para os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* nestas espécies exibem a mesma disposição que os de *C. pseudotuberculosis*. Este resultado foi importante, pois, o fato das predições indicarem que o gene *sigE* faz parte de um *operon* em espécies evolutivamente próximas à *C. pseudotuberculosis* sustenta a hipótese de que o mesmo possa estar organizado em *operon* nesta espécie. O resultado gerado por esta ferramenta não revela nenhuma informação a respeito dos critérios que foram utilizados na classificação de *operon*. Possivelmente, a classificação de *operon* foi determinada devido a presença de sequências intergênicas pequenas, ausência de sítios de terminação da transcrição, após as ORFs dos genes *sigE* e *cseE*, e ausência de promotores internos à montante dos genes *cseE* e *tatB*. Portanto, foi necessário utilizar outras ferramentas na caracterização *in silico* destes genes para identificar possíveis promotores e sítios de terminação da transcrição.

As análises *in silico* adicionais, por diferentes ferramentas, foram realizadas neste trabalho na tentativa de identificar os possíveis promotores e sítio de terminação responsáveis pela regulação da transcrição dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB*. Três promotores já haviam sido previamente identificados *in silico* numa região de 1000 pb a montante do gene *sigE* (Pacheco, 2010). Portanto este trabalho somente avaliou as sequências das regiões intergênicas ou das ORFs dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB*. O resultado indica a existência de um promotor localizado no início, porém dentro da ORF do gene *cseE* e um segundo promotor no início da ORF do *tatB*.

Em *M. tuberculosis* o *operon* do gene codificador do sigma E desta espécie é regulado a partir de 3 promotores, sendo que o promotor que é reconhecido pelo sigma H se localiza à 63 pb dentro da sequência codificante do gene *sigE*, e que devido a isso a proteína deste fator possui duas isoformas. No entanto foi demonstrado que ambas as isoformas são funcionais nesta bactéria (Doná *et al.*, 2012). Neste sentido, apesar de alguns promotores identificados em *C. pseudotuberculosis* estarem localizados a poucos pares de bases dentro da ORF de *cseE* e *tatB*, existe a possibilidade de que estes genes sejam regulados individualmente a partir dos próprios promotores.

O presente trabalho identificou sítios de terminação dentro e após 104 pb da ORF do gene *tatB*. Os sítios localizados dentro da ORF do *tatB* poderiam estar associados ao término da transcrição de *sigE* e *cseE* sugerindo que somente estes genes possam ser transcritos juntos, enquanto o gene *tatB* poderia ser regulado independentemente do *operon*. É importante ressaltar que este trabalho somente avaliou a presença de sítios de terminação rho-independentes. Portanto podem existir outros tipos de sítios de terminação como do tipo rho-dependente, que precisam se ligar a outros fatores para impedir a continuação da transcrição.

Além das análises *in silico*, este trabalho demonstrou experimentalmente, através da técnica de RT-PCR com diferentes combinações de iniciadores, que os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* são transcritos em uma mesma molécula de mRNA a partir de um mesmo promotor. Este resultado corroborou com o que foi obtido pela predição de *operon* realizada para *C. pseudotuberculosis* pela ferramenta DOOR v2.0. Porém de acordo com a predição por esta mesma ferramenta para a espécie *C. glutamicum*, o gene *sigE* não faz parte do *operon* que foi predito para os genes *cseE* e *tatB* sendo que um estudo comprovou que os genes *sigE* e *cseE* de *C. glutamicum* são transcritos conjuntamente (Park *et al.*, 2008). Isto demonstra que predições *in silico* de *operons* não são análises precisas e destaca a importância da confirmação experimental.

Segundo Okuda et al. (2007), existem diferentes classes de *operons* quanto a forma de transcrição. Múltiplos genes podem fazer parte de um mesmo *operon* e ainda serem regulados independentemente a partir de promotores internos que são ativados por estímulos ambientais. Em *L. monocytogenes*, um patógeno intracelular facultativo Gram positivo, a ativação de genes de virulência está sob o controle do ativador transcricional PrfA (Leimeister-Wächter et al., 1992). O gene que codifica PrfA é transcrito através do seu próprio promotor como um transcrito monocistrônico em ambiente em torno de 30°C. Em 37°C, além do transcrito monocistrônico, o gene *prfA* é transcrito também a partir de um promotor diferente como um transcrito bicistrônico que compreende os genes *prfA* e *pic* codificando proteínas que atuam rompendo a membrana do hospedeiro através de hidrólise dos lipídeos.

Considerando que o presente trabalho identificou, em *C. pseudotuberculosis*, promotores internos ao *operon* que contém os genes *sigE*, *cseE* e *tatB* na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, existe a possibilidade destes genes serem regulados de forma independente em resposta a estímulos do ambiente. Entretanto, são necessárias futuras investigações para confirmar experimentalmente a presença destes promotores.

A avaliação da susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* 1002 aos estresses nitrosativo e ácido foi realizada com o intuito de certificar-se de que a bactéria estaria sofrendo os efeitos dos estresses utilizados na avaliação de expressão gênica deste trabalho. Foi possível confirmar uma alteração no crescimento das culturas que foram tratadas com DETA/NO (100uM) e acidificação do meio de cultivo (pH 5.5). O efeito do estresse nitrosativo pareceu ser bacteriostático, mas não bactericida, uma vez que não houve alteração significativa da viabilidade celular por contagem de unidades formadoras de colônias e pelo fato da cultura tratada ter retomado completamente o crescimento após 6h de aplicação do DETA/NO. Um efeito bacteriostático parecido foi observado por Ogawa et al. (2001) quando a bactéria *L. monocytogenes* foi exposta ao estresse nitrosativo, inclusive sob altas concentrações (1mM e 10mM) de agente doador de óxido nítrico adicionado nas culturas. Este autor observou que o crescimento de *L. monocytogenes* é reduzido enquanto que a viabilidade celular das culturas tratadas não foi diferente das culturas controles.

No presente trabalho, o estresse ácido (pH 5.5) foi capaz de causar uma redução (cerca de 40%) do crescimento da cultura tratada, causando também uma diminuição da viabilidade celular da cultura submetida ao estresse em relação à cultura controle. Um resultado parecido foi obtido por Pacheco (2010) quando a mesma linhagem selvagem, 1002 de *C. pseudotuberculosis* foi exposta ao meio ácido (pH 5.5).

Este trabalho utilizou uma concentração de DETA/NO e um valor de pH que puderam causar um efeito sub-inibitório sobre a bactéria, não ocorrendo morte celular excessiva, o que poderia levar a uma quantificação de RNA que correspondesse fisiologicamente à uma resposta inespecífica. Neste sentido, os efeitos fenotípicos observados pela análise de susceptibilidade serviram para inferir que as alterações observadas nas análises de RT-qPCR foram estimuladas pelos efeitos causados pelos estresses nitrosativo e ácido.

De acordo com os resultados obtidos pelas análises de quantificação relativa, este trabalho demonstrou que o gene *sigE* de *C. pseudotuberculosis* é regulado positivamente em resposta aos estresses nitrosativo e ácido *in vitro*. Vale a pena ressaltar que a expressão do gene codificador do fator sigma E de *C. pseudotuberculosis* em resposta ao estresse nitrosativo ainda não tinha sido avaliada nesta bactéria.

Apenas estudos envolvendo outras espécies de bactérias patogênicas demonstraram que o gene *sigE* é regulado positivamente durante a infecção de macrófagos (Ohno et al., 2003; Schnappinger et al. 2003; Talaat et al., 2004) e recentemente, foi demonstrado que este gene participa na resposta transcricional de *M. tuberculosis* em exposição ao NO *in vitro* (Voskuil et al., 2011).

Os resultados obtidos pelo presente trabalho confirmaram o envolvimento do fator sigma E na resposta adaptativa de *C. pseudotuberculosis* aos estresses nitrosativo e ácido corroborando com os achados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa nos quais foram observados que a linhagem mutante para este fator apresentou uma maior susceptibilidade frente aos estresses nitrosativo e ácido (Pacheco et al., 2012) e que o gene *sigE* é mais expresso na condição de acidez (pH 5.0) (Pinto, 2012).

Em outros microrganismos os fatores sigma ECF ativam a transcrição de genes envolvidos em processos relacionados ao envelope celular bacteriano, incluindo secreção, síntese de exopolissacarídeos, influxo/efluxo de ferro, e síntese de proteases extracelulares. (Helmann, 2002; Bashyam & Hasnai, 2004; Jordan et al., 2008). Um fato interessante é que no trabalho de Pacheco et al. (2012) foram identificadas proteínas secretadas diferencialmente expressas na linhagem selvagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* em exposição ao DETA/NO (100µM), que não foram detectadas na linhagem mutante para o fator sigma E frente a condição de estresse nitrosativo. Este autor sugere que proteínas envolvidas na aquisição ferro e detoxificação do óxido nítrico possivelmente fazem parte do *regulon* reconhecido pelo fator sigma E nesta bactéria. Estudos recentes sobre a resposta transcricional de *M. tuberculosis* e *M. bovis* sob condições de estresse nitrosativo também demonstraram que estas bactérias regulam positivamente genes envolvidos na aquisição de ferro (Voskuil et al., 2011). No trabalho de Pinto (2012) no qual foi avaliado o transcriptoma

de *C. pseudotuberculosis* 1002 em resposta ao estresse ácido, foi observada a ativação de vários genes envolvidos na captação de íons metálicos e homeostasia de oxi-redução. É possível sugerir, portanto, sobreposição dos mecanismos envolvidos na resposta ao NO e no controle da acidez celular na resposta adaptativa de *C. pseudotuberculosis*.

Na cultura submetida ao estresse nitrosativo do presente trabalho, os genes *cseE* e *tatB* foram positivamente regulados em duas de três réplicas biológicas. Isto sugere que ambos os genes possam estar envolvidos na resposta ao estresse nitrosativo. Porém, foi observado que em uma das 3 réplicas não ocorreu variação significativa dos genes *cseE* e *tatB* e isto pode ter ocorrido devido a um problema de quantificação na dosagem do RNA total extraído da cultura controle ou da cultura tratada. A quantificação de RNA total por espectrofotometria nem sempre é precisa e pode ter superestimado o valor da concentração de RNA, uma vez que este ácido nucleico se degrada facilmente na presença de RNases. Possivelmente deve ter ocorrido degradação das moléculas durante a manipulação das amostras no processo de extração de RNA.

Nas culturas expostas ao estresse ácido, o gene *cseE* foi ativado em todas as réplicas biológicas, sugerindo que a sua expressão é importante também durante a resposta adaptativa de *C. pseudotuberculosis* ao estresse ácido. Na espécie *C. glutamicum* um estudo revela que o gene *cseE* é mais expresso quando a bactéria é exposta a temperaturas elevadas, sendo também co-transcrito com o gene *sigE*. Ainda neste mesmo estudo foi demonstrado que as proteínas do fator sigma E e do fator anti-sigma interagem entre si fisicamente e que linhagens mutantes para o gene *cseE* apresentam um fenótipo de super atividade do fator sigma E, sugerindo que nesta espécie o gene *cseE* desempenha uma função reguladora antagonista do fator sigma E (Park *et al.*, 2008).

Considerando estes dados, o gene *cseE* de *C. pseudotuberculosis* possivelmente codifica um fator anti-sigma, visto que este gene possui homologia com fatores anti-sigma de outras bactérias evolutivamente próximas do grupo CMNR como *M. tuberculosis* e *C. glutamicum* sendo que este gene também se encontra organizado em *operon* com o gene *sigE* nestas espécies (Dona *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). De acordo com o que é relatado na literatura, a atividade dos fatores sigma ECF é regulada por um sistema de transdução de sinal de dois componentes denominado complexo σ - anti- σ que se localiza na membrana da célula (Yoshimura *et al.*, 2004; West *et al.*, 2001; Raivio *et al.*, 2001). Quando a célula sofre a ação de um determinado estresse a proteína do fator anti-sigma é clivada, liberando o fator sigma deste complexo inativo, que pode então se associar a RNAP para ativar a transcrição de genes envolvidos na resposta ao estresse (West *et al.*, 2001). Em alguns casos, os promotores dos genes codificadores de fatores sigma ECF são reconhecidos pelo

próprio fator sigma que está sendo produzido. Segundo Helmann (2002) o mecanismo de auto-regulação serve para amplificar o sinal induzido pelo complexo σ - anti- σ . Neste sentido, como o gene *sigE*, avaliado no presente trabalho, mostrou um aumento no nível de transcrição em resposta aos estresses, é possível sugerir que este gene sofra uma auto-regulação na espécie *C. pseudotuberculosis* 1002.

Em contraste do que foi observado no trabalho de Pinto (2012), o presente trabalho não observou diferença significativa da expressão do gene *tatB* nas três réplicas biológicas das culturas submetidas ao estresse ácido, sugerindo que este gene possa estar envolvido especificamente na resposta ao estresse nitrosativo. O gene *tatB* de espécies do gênero *Mycobacterium* codifica um dos componentes do sistema TAT de secreção que está envolvido na resposta adaptativa aos estresses ambientais, através da secreção de proteínas detoxificantes e que conferem resistência à antibióticos (Posey *et al.*, 2006). No entanto, um estudo que envolveu a geração de uma linhagem de *M. tuberculosis* mutante para o gene *tatB* demonstrou que a mutação causada neste gene não foi capaz de alterar o funcionamento do sistema de secreção TAT. De forma similar à *C. pseudotuberculosis*, este estudo envolvendo a espécie *M. tuberculosis* também revela que o gene *tatB* está localizado junto com genes reguladores do fator sigma E e distante dos outros componentes (*tatA* e *tatC*), considerados essenciais para o funcionamento deste sistema de secreção. Este autor sugere, portanto que o gene *tatB* possa estar envolvido na regulação do fator sigma E (McDonough *et al.*, 2005).

Além disso, pelo fato do gene *tatB* de *C. pseudotuberculosis* ser transcrito conjuntamente com os genes *sigE* e *cseE* nesta bactéria durante condições normais de crescimento, era esperado que o gene *tatB* também fosse mais expresso em resposta ao estresse ácido e no entanto, isto não foi observado. A alternância da ativação de transcrição de genes que constituem um mesmo *operon* também foi observada por Güell *et al.* (2009) trabalhando com *M. pneumoniae*, onde a transcrição alternativa foi apresentada em resposta a diferentes condições de crescimento. Segundo este autor, provavelmente devido a uma regulação por RNA antisense o organismo consiga alterar a estrutura do *operon* levando a uma transcrição diferente dentro dos *operons*, visando à sobrevivência em um ambiente hostil.

Neste contexto, novas investigações são necessárias para confirmar a existência de um mecanismo complexo que possa estar envolvido na regulação das unidades transcricionais do *operon* de *C. pseudotuberculosis* identificado neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho permitiu identificar e caracterizar, em parte, a regulação da transcrição do *operon* do fator sigma E de *C. pseudotuberculosis* 1002; confirmar o papel deste fator na resposta adaptativa dessa bactéria ao estresse nitrosativo e ácido, sugerindo uma possível sobreposição dos mecanismos envolvidos na detoxificação do óxido nítrico e no controle da acidez celular na resposta adaptativa de *C. pseudotuberculosis*; e sugerir a existência de um mecanismo complexo de regulação diferencial das unidades transcricionais dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB*. Considerando os achados obtidos por este trabalho, é sugerido que estudos complementares sobre o mecanismo de regulação transcricional do *operon* do fator sigma E alternativo de *C. pseudotuberculosis* sejam feitos uma vez que os genes deste *operon* se mostraram importantes para a resposta a alguns tipos de estresses ambientais, podendo ser, assim, cruciais para a sobrevivência dessa bactéria durante a infecção do hospedeiro.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre perspectivas para:

- Utilizar a técnica de 5'RACE na:
 - Identificação experimental dos sítios de início de transcrição dos genes *sigE*, *cseE* e *tatB* através do sequenciamento das extremidades dos transcritos
 - Avaliação, *in vitro*, dos promotores que são ativados em resposta ao estresse nitrosativo
 - Avaliação, *in vitro*, dos promotores que são ativados em resposta ao estresse ácido pela técnica de 5' RACE.
- Avaliar a expressão diferencial dos genes deste *operon* em resposta aos estresses osmótico, térmico, oxidativo e de superfície celular (SDS) pela técnica de RT-qPCR.
- Caracterizar o transcriptoma da linhagem mutante para o fator sigma E quando cultivada em condições normais e durante a infecção de macrófagos.

8. REFÊRENCIAS

ALVES, F. S. F., PINHEIRO, R. R., PIRES, P. C. Linfadenite caseosa: patogenia - diagnóstico - controle, Artigo Técnico. Documento nº 27, Embrapa Sobral CE, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997.

APPLIED BIOSYSTEMS. Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf>, 2012a.

APPLIED BIOSYSTEMS. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. Disponível em: <>, 2012b.

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.*, v.137, p.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.

BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.*, v. 63, n.9, p. 269–272. 1986.

BIBERSTEIN, E. L., HIRSH, D. C. 2003. *Corynebactérias; Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes; Rhodococcus equi*. In: Hirsh D.C. & Zee Y.C. (Ed.), *Microbiologia Veterinária*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2.ed. p.119-126, 1971.

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.

BORUKHOV, S., NUDLER, E. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Current Opinion in Microbiology* 6, 93-100, 2003.

BROWNING, D. F., BUSBY, S. J. W. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Micro* 2, 57-65, 2004.

BUXTON, A., FRASER, G. *Corynebacterium*, in: Buxton A., Fraser G. (Eds.), *Animal Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh. p. 177–183, 1977.

CASES I, DE LORENZO V. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol.* 3(2):105-18, 2005.

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 (Mestrado em Genética) Universidade Federal de Minas Gerais, pp. 1-112, 2009.

CHARLET, D., MOSTOWY, S., ALEXANDER, D., SIT, L., WIKER, H.G., BEHR, M.A. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK. *Mol. Microbiol.*, v. 56, p. 1302–1313, 2005.

DOMINGUETTI C. P. Análise do papel do fator *sigma* C na resposta de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse ambiental. Dissertação (Mestrado em Genética) Universidade Federal de Minas Gerais, pp. 1-114, 2011.

DONA, V., RODRIGUE, S., DAINESE, E., PALU, G., GAUDREAU, L., MANGANELLI, R. AND PROVVEDI, R. Evidence of complex transcriptional, translational, and posttranslational regulation of the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 190, 5963-5971, 2008.

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.*, v. 37, p. 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.; OLIVEIRA, 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. Environm. Microbiol.* v.72, p. 7368-7372, 2006b.

DOW, J. M., DANIELS, M.J. Xylella genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* 17: pp. 263-71, 2000.

DOUKHAN, L., PREDICH, M., NAIR, G., DUSSURGET, O., MANDIC-MULEC, I., COLE, S. T., SMITH, D. R., SMITH, I. Genomic organization of the mycobacterial sigma gene cluster. *Gene*. 165(1):67-70, 1995.

FERREIRA, A., GRAY, M., WIEDMANN, M., BOOR, K. J. Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. *Curr Microbiol.* 48(1):39-46, 2004.

FONTÁN, P. A., ARIS, V., ALVAREZ, M. E., GHANNY, S., CHENG, J., SOTEROPOULOS, P., TREVANI, A., PINE, R., SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor E regulon modulates the host inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 198: 877-885, 2008.

GARDNER, P. R., COSTANTINO, G., SALZMAN, A. L. Constitutive and adaptive detoxification of nitric oxide in *Escherichia coli*. Role of nitric-oxide dioxygenase in the protection of aconitase. *J. Biol. Chem.* 273: 26528-26533, 1998.

GAUTHERET D, LAMBERT A. Direct RNA Motif Definition and Identification from Multiple Sequence Alignments using Secondary Structure Profiles. *J Mol Biol.* 313:1003–11, 2001.

GÜELL, M.; VAN NOORT, V.; YUS, E.; CHEN, W.-H.; LEIGH-BELL, J.; MICHALODIMITRAKIS, K.; YAMADA, T.; ARUMUGAM, M.; DOERKS, T.; KÜHNER, S. et al. Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science (New York, N.Y.)*, v. 326, p. 1268-71, 2009.

GRUBER, T. M. AND GROSS, C. A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology* 57, 441-466, 2003.

HARD, G.C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*, J. Med. Microbiol., v. 5, p. 483–491, 1972.

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

HODGSON, A. L., 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.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 593, 1994.

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

JONES, D., COLLINS, M. D. Irregular, nonsporing gram-positive rods. P. 1261–1579 IN: *bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG (Eds.). Williams & Wilkins, Co., Baltimore, MD, 1986.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia Veterinária*. 6 ed. São Paulo:Manole, 2000.

JORDAN, S., HUTCHINGS, M.I., MASCHER, T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 107-146, 2008.

KAUSHAL, D., SCHROEDER, B. G., TYAGI, S., YOSHIMATSU, T., SCOTT, C., KO, C., CARPENTER, L., MEHROTRA, J., MANABE, Y. C., FLEISCHMANN, R. D., BISHAI, W. R. Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, sigH. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 12, p. 8330-8335, 2002.

KAZMIERCZAK, M. J., MITHOE, S.C., BOOR, K.J., WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* 185: pp. 5722-34, 2003.

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.

KOFFAS, M., STEPHANOPOULOS, G. Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16: 361-366, 2005.

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

LARISCH, C., NAKUNST, D., HUSER, 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.*, v. 8, p. 4, 2007.

- LEIMEISTER-WÄCHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *Journal of bacteriology*, v. 174, p. 947-52, 1992.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *MET*. v. 25, p. 402–408, 2001.
- MACKE, T., ECKER, D., GUTELL, R., GAUTHERET, D., CASE, D. A., SAMPATH, R. RNAMotif – A new RNA secondary structure definition and discovery algorithm. *Nucleic Acids Res.* 29:4724–4735, 2001.
- MANGANELLI, R., DUBNAU, E., TYAGI, S. KRAMER, F. R.; SMITH, I. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* v. 31, p. 715-24, 1999.
- MANGANELLI, R., VOSKUIL, M. I., SCHOOLNIK, G. K., DUBNAU, E., GOMEZ, M., SMITH, I. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor σ^H in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol. Microbiol.* v.45, 365-374, 2002.
- MAO F., DAM P., CHOU J., OLMAN V., XU Y. DOOR: a Database of prOkaryotic OpeRons. *Nucl. Acids Res.* 37: D459-D463, 2009.
- MARLES-WRIGHT J, LEWIS RJ. Stress responses of bacteria. *Curr Opin Struct Biol.* 17(6):755-60, 2007
- MCDONOUGH, J. A., HACKER, K. E., FLORES, A. R., PAVELKA, M. S., BRAUNSTEIN, M. The Twin-Arginine Translocation Pathway of *Mycobacterium smegmatis* Is Functional and Required for the Export of Mycobacterial β -Lactamases. *Journal of bacteriology* 187: 7667–7679, 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., BRADLEY, G.A., SONGER, J.G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 12: 921-930, 1994.
- MERCHANT, I. A., PACKER, R. A. The Genus *Corynebacterium*, in: Merchant I. A., Packer R. A. (Eds.), *Veterinary bacteriology and virology*, The Iowa State University Press, Iowa, pp. 425–440, 1967.
- MISSIAKAS, D., RAINA, S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. pp. 1059-1066, 1998.
- MITSUMOTO, A., KIM, K. R., OSHIMA, G., KUNIMOTO, M., OKAWA, K., IWAMATSU, A., NAKAGAWA, Y. Glyoxalase I is a novel nitric-oxide-responsive protein. *Biochem. J.* 344 Pt 3: 837-844, 1999.

MOONEY, R. A., DARST, S.A., LANDICK, R. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol Cell* 20:335-345, 2005.

MOORE, R., MIYOSHI, A., PACHECO, L. G. C., SEYFFERT, N., AZEVEDO, V. *Corynebacterium* and *Arcanobacterium* in: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition, Wiley-Blackwell, Oxford, UK. , 2010.

MOURA-COSTA, L. F., PAULE, B. J. A., AZEVEDO, V., FREIRE, S. M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., REGIS, L. F., VALE, V. L. C., MATOS, D. P., BAHIA, R. C., CARMINATI, R., MEYER, R. Chemically defined synthetic medium for *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture. *Rev. Bras. Saúde e Produção Animal*, v. 3, p. 1-9, 2002.

MUCKLE, C.A. & GYLES, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Can. J. Comp. Med.*, v. 46, p. 206–208, 1982.

MULLER, C., BANG, I., VELAYUDHAN, J., KARLINSEY, J., PAPENFORT, K., VOGEL, J., FANG, F.C. Acid stress activation of the sigma(E) stress response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 71: 1228-1238, 2009.

NAKUNST, D., LARISCH, C., HUSER, A. T., TAUCH, A., PUHLER, A., KALINOWSKI, J. The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *J Bacteriol.* 189(13):4696-707, 2007.

NATHAN, C., SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 8841-8848, 2000.

NESVERA, J., PATEK, M. Plasmids and promoters in *Corynebacteria* and their applications. In: BURKOVSKI, A. *Corynebacteria: genomics and molecular biology*. United Kingdom: Caister Academic Press. p. 113-154, 2008.

OGAWA, R., PACHELLI, R., ESPEY, M. G., MIRANDA K. M., FRIEDMAN, N., KIM, S., COX, G., MITCHELL, J. B., WINK, D. A., RUSSO, A. Comparison of control of *Listeria* by nitric oxide redox chemistry from murine macrophages and no donors: insights into listericidal activity of oxidative and nitrosative stress. *Biology & Medicine*, Vol. 30, No. 3, pp. 268–276, 2001.

OHNO, H., ZHU, G., MOHAN, V. P., CHU, D., KOHNO, S., JACOBS, W. R. J., CHAN, J. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 5: 637-648, 2003.

OKUDA, S., KAWASHIMA, S., KOBAYASHI, K., OGASAWARA, N., KANEHISA, M., GOTO, S. Characterization of relationships between transcriptional units and operon structures in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *BMC Genomics* 8:48, 2007.

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.*, v. 66, p. 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. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

PACHECO, L. G., CASTRO, T. L., CARVALHO, R. D., MORAES, P. M., DORELLA, F. A., CARVALHO, N. B., SLADE, S. E., SCRIVENS, J. H., FEELISCH, M., MEYER, R., MIYOSHI, A., OLIVEIRA, S. C., DOWSON, C. G., AZEVEDO V. A. A role for sigma factor SigE in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/ peroxide stress. *Front. Microbio.* 3:126, 2012.

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

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.*, v. 71, p. 47–49, 1994.

PINTO, A. C. Análise em larga escala da expressão diferencial de *corynebacterium pseudotuberculosis* em resposta a estresses abióticos. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, pp. 1-214, 2011.

POSEY, J. E., SHINNICK, T. M., QUINN, F. D. Characterization of the Twin-Arginine Translocase Secretion System of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 188, 1332-1340, 2006.

POTVIN, E., SANSCHAGRIN, F., LEVESQUE, R. C. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* 32(1):38-55, 2008.

RAIVIO, T. L., SILHAVY, T. J. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annual Review of Microbiology* 55, 591-624, 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.

RICHARDSON, A. R., SOLIVEN, K. C., CASTOR, M. E., BARNES, P. D., LIBBY, S. J., FANG, F. C. The Base Excision Repair system of *Salmonella enterica* serovar typhimurium counteracts DNA damage by host nitric oxide. *Plos Pathog.* 5: e1000451, 2009.

RODRIGUE, S., PROVVEDI, R., JACQUES, P. E., GAUDREAU, L., MANGANELLI, R. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 30, p. 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., TYIAGI, A.K., SINGH, Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.*, v. 277, p. 605-626, 2009.

SCHAIBLE, U. *Mycobacterium tuberculosis* and His Comrades. In: *Intracellular niches of microbes*. Schaible, U.E., Haas, A. Wiley-Blackwell: 2009.

SCHNAPPINGER, D., EHRT, S., VOSKUIL, M. I., LIU, Y., MANGAN, J. A., MONAHAN, I. M., DOLGANOV, G., EFRON, B., BUTCHER, P. D., NATHAN, C., SCHOOLNIK, G. K. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J. Exp. Med.* 198: 693-704, 2003.

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.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5: 156–160, 1997.

SOUZA, B. M. 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 (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, pp: 1-114, 2011.

STARON, A., SOFIA, H. J., DIETRICH, S., ULRICH, L. E., LIESEGANG, H., MASCHER, T. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol. Microbiol.*, v. 74, p. 557-581, 2009.

TALAAAT, A. M., LYONS, R., HOWARD, S. T., JOHNSTON, S. A. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 4602-4607, 2004.

TAYLOR, W. E., STRAUS, D. B., GROSSMAN, A. D., BURTON, Z. F., GROSS, C. A., BURGESS, R. R. Transcription from a heat-inducible promoter causes heat shock regulation of the sigma subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Cell.* 38(2):371-81, 1984.

VOSKUIL, M. I., BARTEK, I. L., VISCONTI, K., SCHOOLNIK, G. K. The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Frontiers in Microbiology*, v.2 105, 2011.

WEST, A. H., STOCK, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26, 369-376, 2001.

WILLIAMSON, L. H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, v. 17, p. 359–371, 2001.

WINK, D. A., KASPRZAK, K. S., MARAGOS, C. M., ELESURU, R. K., MISRA, M., DUNAMS, T. M., CEBULA, T. A., KOCH, W. H., ANDREWS, A. W., ALLEN, J. S. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254: 1001-1003, 1991.

YOSHIMURA, M., ASAI, K., SADAIE, Y., YOSHIKAWA, H. Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology* 150, 591-599, 2004.