


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



Dissertação de Mestrado



**Análise do papel do fator *sigma C* na
resposta de *Corynebacterium
pseudotuberculosis* a diferentes condições
de estresse ambiental**

Caroline Pereira Domingueti

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Azevedo

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2011

Caroline Pereira Domingueti

**Análise do papel do fator *sigma C* na
resposta de *Corynebacterium
pseudotuberculosis* a diferentes condições
de estresse ambiental**

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

Orientador: Prof. Dr. Vasco Azevedo

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2011

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu pai Helder, à minha mãe Rozilene e aos meus irmãos Helder e Carine que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me incentivando.

*“Todos querem viver no topo da montanha,
mas toda felicidade e crescimento
ocorre quando se está escalando-a.”*

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao meu co-orientador prof. Dr. Anderson Miyoshi pelos ensinamentos e pela grande ajuda fornecida;

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 Bianca, minha dupla, por dividir comigo os momentos de alegria e de tristeza durante todo o mestrado;

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

Aos meus irmãos Helder e Carine pela compreensão e pelo incentivo;

Ao Francisco pelo apoio, pela torcida e pelo carinho;

E principalmente, aos meus pais por sempre terem acreditado e confiado em mim.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Linfadenite caseosa	4
1.1.1 Impactos econômicos	4
1.1.2 Patogenia e imunologia	5
1.1.3 Epidemiologia	6
1.1.4 Transmissão	7
1.1.5 Tratamento	8
1.1.6 Profilaxia	8
1.1.6.1 Diagnóstico	9
1.1.6.2 Vacinas	10
1.1.6.2.1 Vacinas comerciais	11
1.1.6.2.2 Vacinas experimentais	12
1.2 O gênero <i>Corynebacterium</i>	13
1.3 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	13
1.3.1 Aspectos microbiológicos	14
1.3.2 Propriedades bioquímicas	14
1.3.3 Taxonomia	14
1.3.4 Suscetibilidade antimicrobiana	15
1.3.5 Fatores de virulência	16
1.3.5.1 Fosfolipase D	16
1.3.5.2 Lipídeos tóxicos da parede celular	17
1.3.5.3 Novos candidatos	17
1.4 Fatores <i>sigma</i> bacterianos	18
1.4.1 Fatores <i>sigma</i> alternativos	20
1.4.2 Fatores <i>sigma</i> de função extracitoplasmática (ECF)	22
1.4.3 Fatores <i>sigma</i> e virulência	25
1.4.4 Fatores <i>sigma</i> alternativos de <i>C. pseudotuberculosis</i>	28
1.4.5 Fator <i>sigma</i> C	28
1.4.5.1 Fator <i>sigma</i> C e ilhas de patogenicidade de <i>C. pseudotuberculosis</i>	31

2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	36
3.2 Construção de uma linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma C</i>	36
3.3 Caracterização morfológica, bioquímica e molecular da linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma C</i>	38
3.4 Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma C</i>	39
3.5 Condições de estresse <i>in vitro</i>	40
3.6 Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem e mutante para o fator <i>sigma C</i>	41
3.7 Resistência das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem e mutante para o fator <i>sigma C</i> às condições de estresse <i>in vitro</i>	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Construção de uma linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma C</i>	46
4.2 Geração de uma linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma C</i>	47
4.3 Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma C</i>	48
4.4 Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem e mutante para o fator <i>sigma</i>	51
4.5 Resistência das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem e mutante para o fator <i>sigma C</i> às condições de estresse <i>in vitro</i>	52
4.5.1 Resistência das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem e mutante para o fator <i>sigma C</i> ao estresse oxidativo	53
4.5.2 Resistência das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem e mutante para o fator <i>sigma C</i> ao estresse ácido	59
4.5.3 Resistência das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem e mutante para o fator <i>sigma C</i> ao estresse osmótico	64
4.5.4 Resistência das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem e mutante para o fator <i>sigma C</i> ao estresse térmico	70
5. CONCLUSÕES	77
6. PERSPECTIVAS	79

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8. ANEXOS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação esquemática das regiões conservadas dos fatores <i>sigma</i> dos grupos 1, 2, 3 e 4 e das regiões promotoras que elas reconhecem.	19
Figura 1.2. Domínios dos fatores <i>sigma</i> primários (A) e dos fatores <i>sigma</i> ECF (B) e seqüências consenso das regiões promotoras -35 e -10 reconhecidas por eles.	21
Figura 1.3. Localização do gene <i>sigC</i> (Cp1002_172) no genoma da linhagem 1002 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	30
Figura 1.4. Possíveis regiões promotoras do gene <i>sigC</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> numa região de 1500 pb à montante do início da ORF deste gene.	31
Figura 3.1. Representação esquemática do evento de recombinação homóloga simples entre o plasmídeo pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [®]) contendo o fragmento do gene que codifica o fator <i>sigma</i> C e o gene que codifica este fator <i>sigma</i> presente no cromossomo bacteriano para gerar uma linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> C.	38
Figura 3.2. Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> C.	40
Figura 3.3. Representação esquemática da etapa inicial da curva de crescimento para avaliação da suscetibilidade de <i>C. pseudotuberculosis</i> a agentes geradores de estresse.	43
Figura 3.4. Representação esquemática dos procedimentos adotados para o monitoramento das curvas de crescimento em intervalos de tempo específicos.	44
Figura 4.1. Confirmação da presença do fragmento do gene que codifica o fator <i>sigma</i> C no pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [®]) através de digestão com a endonuclease de restrição <i>EcoRI</i> (Invitrogen [®]).	46
Figura 4.2. Confirmação da presença do fragmento do gene que codifica o fator <i>sigma</i> C no pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [®]) através de PCR.	47
Figura 4.3. Ensaio de PCR multiplex para caracterização molecular da linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> C.	48
Figura 4.4. Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> C através de ensaios de PCR.	49
Figura 4.5. Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fatores <i>sigma</i> C através de um ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores sigCe_F – sigCe_R.	50
Figura 4.6. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC).	52

Figura 4.7. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 70mM) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse).	54
Figura 4.8. Crescimento relativo das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 70mM) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse).	55
Figura 4.9. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 70mM) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse).	56
Figura 4.10. Viabilidade relativa das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 70mM) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse).	57
Figura 4.11. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse).	60
Figura 4.12. Crescimento relativo das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse).	61
Figura 4.13. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse).	62
Figura 4.14. Viabilidade relativa das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse).	63
Figura 4.15. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse).	65

Figura 4.16. Crescimento relativo das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse).	66
Figura 4.17. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse).	67
Figura 4.18. Viabilidade relativa das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse).	68
Figura 4.19. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse).	71
Figura 4.20. Crescimento relativo das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse).	72
Figura 4.21. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse).	73
Figura 4.22. Viabilidade relativa das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator <i>sigma</i> C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse).	74
Figura 8.1. Confirmação da presença dos fragmentos dos genes que codificam os fatores <i>sigma</i> B, D, H, K e M no pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [®]) através de PCR. . . .	99
Figura 8.2. Confirmação da presença dos fragmentos dos genes que codificam os fatores <i>sigma</i> B, D, H, K e M no pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [®]) através de digestão com a endonuclease de restrição <i>EcoRI</i> (Invitrogen [®]).	100
Figura 8.3. Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> B através de ensaios de PCR. . . .	101
Figura 8.4. Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> D através de ensaios de PCR. . . .	102

Figura 8.5. Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> H através de ensaios de PCR.	103
Figura 8.6 – Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> K através de ensaios de PCR.	104
Figura 8.7. Confirmação do evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma</i> M através de ensaios de PCR.	105
Figura 8.8. Confirmação do evento de recombinação nas linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutantes para os fatores <i>sigma</i> B, D, H, K e M através de um ensaio de PCR.	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Fatores sigma alternativos envolvidos na virulência de diferentes bactérias patogênicas.	26
Tabela 3.1. Iniciadores utilizados para a amplificação do fragmento interno do gene que codifica o fator <i>sigma C</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	36
Tabela 3.2. Condições utilizadas para a amplificação do fragmento interno do gene que codifica o fator <i>sigma C</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	36
Tabela 3.3. Iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma C</i>	39
Tabela 3.4. Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação na linhagem de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutante para o fator <i>sigma C</i> e tamanho esperado dos fragmentos nas reações de PCR	39
Tabela 3.5. Condições de estresse <i>in vitro</i> e resistência da linhagem 1002 de <i>C. pseudotuberculosis</i> às diferentes condições de estresse.	41
Tabela 8.1. Iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos internos dos genes que codificam os fatores <i>sigma B</i> , <i>D</i> , <i>H</i> , <i>K</i> e <i>M</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	96
Tabela 8.2. Condições utilizadas para a amplificação dos fragmentos internos dos genes que codificam os fatores <i>sigma B</i> , <i>D</i> , <i>H</i> , <i>K</i> e <i>M</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	96
Tabela 8.3. Iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação nas linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutantes para os fatores <i>sigma B</i> , <i>D</i> , <i>H</i> , <i>K</i> e <i>M</i> .	97
Tabela 8.4. Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação nas linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> mutantes para os fatores <i>sigma B</i> , <i>D</i> , <i>H</i> , <i>K</i> e <i>M</i> e tamanho esperado dos fragmentos nas reações de PCR . . .	98

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP** – Trifosfato de adenosina
- AUC** – Área sob a curva
- BCG** – Bacilo Calmette-Guérin
- BHI** – Infusão cérebro-coração
- CMN** – *Corynebacterium* – *Mycobacterium* - *Nocardia*
- CTLA-4** – Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
- DFI** – Indução diferencial de fluorescência
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DO** – Densidade ótica
- ECF** – Função extracitoplasmática
- ELISA** – Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
- EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- HCl** – Ácido clorídrico
- HSP** – Proteína do choque térmico
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- LC** – Linfadenite caseosa
- IL-2** – Interleucina 2
- IL-4** – Interleucina 4
- IFN- γ** – Interferon gama
- Kb** - Quilobase
- LB** - Luria-Bertani
- M** – Molar
- mM** - Milimolar
- min** - Minuto
- MiST2** - *Microbial Signal Transduction database*
- mL** - Mililitro
- mPCR** – PCR multiplex
- NaCl** – Cloreto de sódio
- nm** - Nanômetro
- °C** – Graus Celsius
- OH·** – Radical hidroxila
- ORF** – *Open Reading Frame* (matriz aberta de leitura)
- O₂** – Oxigênio molecular
- O₂⁻** – Ânion superóxido
- pb** – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
pId – Fosfolipase D
qsp – Quantidade suficiente para
rDNA – DNA codificador do RNA ribossômico
rpoB – Subunidade beta da RNA polimerase
RNA – Ácido ribonucléico
rRNA – RNA ribossômico
ROS - Espécies reativas do oxigênio
SDS – Dodecil sulfato de sódio
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
tRNA – RNA transportador
UFC – Unidade formadora de colônia
 μ g – Micrograma
 μ M – Micromolar
 μ m – Micrômetro
wt – Selvagem

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, causadora da linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. Para causar uma infecção bem sucedida, este patógeno intracelular facultativo precisa responder de modo eficiente às alterações do ambiente extracelular, sendo capaz de sobreviver às condições adversas encontradas no organismo hospedeiro. Um dos principais mecanismos utilizados por bactérias patogênicas para alcançar este objetivo consiste na ativação transitória de genes específicos de resposta aos estresses ambientais extracelulares por fatores *sigma* alternativos da RNA polimerase. Com o seqüenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais e Rede Paraense de Genômica e Proteômica, foi possível identificar sete fatores *sigma* alternativos nesta bactéria: os fatores *sigma* B, C, D, E, H, K e M. Dentre estes, destaca-se o fator *sigma* C, o qual tem sido associado à virulência em *Mycobacterium tuberculosis*, e cujo gene se encontra em uma ilha de patogenicidade em *C. pseudotuberculosis*. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo do papel dos fatores *sigma* alternativos de *C. pseudotuberculosis* na resposta a diferentes condições de estresse *in vitro* e na virulência da bactéria. Neste trabalho, foi construída uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* deficiente para o fator *sigma* C, utilizando um plasmídeo suicida, e foi avaliada a resistência desta linhagem aos estresses oxidativo, ácido, osmótico e térmico *in vitro*, através da comparação das diferenças no crescimento relativo e na viabilidade relativa das bactérias expostas às condições de estresse em relação às bactérias crescidas sob condições normais, entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C a cada agente gerador de estresse. Não foi observada uma diferença significativa na susceptibilidade da linhagem mutante para o fator *sigma* C ao estresse ácido em relação à linhagem 1002 selvagem. Contudo, foi verificado que esta linhagem é significativamente mais susceptível aos estresses oxidativo, osmótico e térmico do que a linhagem 1002 selvagem, indicando que o fator *sigma* C deve desempenhar um papel importante para a resposta da bactéria a estas condições de estresse, e possivelmente, para a sua sobrevivência no meio ambiente e no interior do hospedeiro e para a sua virulência.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a Gram-positive bacterium, which causes caseous lymphadenitis in sheep and goats. To cause a successful infection, this facultative intracellular pathogen needs to respond efficiently to the changes in the extracellular environment, being able to survive faced with the harsh conditions found in the host organism. One of the main mechanisms used by pathogenic bacteria to achieve this goal is the transient activation of specific genes in response to extracellular environmental stresses by alternative *sigma* factors of RNA polymerase. After the sequencing of the genome of *C. pseudotuberculosis* by Rede Genoma de Minas Gerais e Rede Paraense de Genômica e Proteômica, it was identified seven alternative *sigma* factors in this bacterium, the *sigma* factors B, C, D, E, H, K and M. Between these, the *sigma* factor C stands out, which has been linked to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*, and whose gene is located in a pathogenicity island in *C. pseudotuberculosis*. In this context, our research group has been studying the role of the alternative *sigma* factors of *C. pseudotuberculosis* in response to different stress conditions *in vitro* and in virulence of the bacterium. In this work, we constructed a strain of *C. pseudotuberculosis* deficient for the *sigma* factor C, using a suicide plasmid, and evaluated the resistance of this strain to oxidative, acid, osmotic and heat stresses *in vitro*, by comparing the differences in relative growth and relative viability of bacteria exposed to stress conditions in relation to bacteria grown under normal conditions, between the successive times of exposure of 1002 wild strain and the strain mutant for the *sigma* factor C for each stress generator agent. There was no significant difference in the susceptibility of the strain mutant for the *sigma* factor C for the acid stress in relation to the 1002 wild strain. However, it was found that this strain is significantly more susceptible to oxidative, osmotic and heat stresses than the 1002 wild strain, showing that the *sigma* factor C should play an important role for the bacterium's response to this stress conditions, and possibly, for its survival in the environment and in the host and for its virulence.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Linfadenite caseosa

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa crônica e recorrente de relevância econômica, causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que acomete caprinos e ovinos. A infecção está associada com a redução da produção de lã, carne e leite, menor eficiência reprodutiva dos animais e condenação de carcaças e couros em abatedouros (Paton *et al.*, 1994; Arsenault *et al.*, 2003).

A doença se manifesta pela presença de necrose nas glândulas linfáticas, apresentando-se em duas formas: a LC externa ou superficial e a LC interna ou visceral. A LC externa é caracterizada pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais, principalmente parotídicos, submandibulares, poplíteos, pré-crurais, supramamários e pré-escapulares, e em tecidos subcutâneos, sendo a forma clínica mais freqüente. Na LC visceral, os abscessos se desenvolvem em nódulos linfáticos mediastínicos e bronquiais, e em órgãos internos, como pulmões, rins, fígado e baço. Estas formas podem ocorrer simultaneamente no mesmo animal (Merchant e Packer, 1967; Piontkowski e Shivers, 1998; Scott, 2007). Quando a infecção afeta o sistema respiratório, os sinais clínicos incluem perda de peso, dispnéia, taquipnéia e tosse crônica. Acredita-se que o envolvimento interno contribua para as síndromes da “ovelha magra” e do “caprino definhado”, as quais se caracterizam pela perda crônica de peso, subfertilidade, queda na produção de leite e nascimento de menor número de cordeiros (Belknap, 2004). Em ovelhas, é comum a disseminação do linfonodo supramamário para o tecido mamário, acarretando uma redução na produção de leite (Radostits *et al.*, 2002). As infecções também podem ser assintomáticas, o que dificulta as análises epidemiológicas sobre a prevalência da doença (Buxton e Fraser, 1977; Paton *et al.*, 1994; Arsenault *et al.*, 2003).

1.1.1 Impactos econômicos

O rebanho mundial de caprinos e ovinos é de aproximadamente 900 milhões de cabeças. O Brasil possui cerca de 23 milhões, sendo 37% de caprinos e 63% de ovinos. Dos caprinos, 1,4% encontra-se na região Norte, 93% no Nordeste, 2,4% no Sudeste, 1,9% no Sul e 1% no Centro-Oeste. Com relação ao rebanho ovino, 2,8% encontra-se na Região Norte, 49% no Nordeste, 2,8% no Sudeste, 40% no Sul e 4,9% no Centro-Oeste (EMBRAPA Semi-Árido).

Os caprinos constituem a principal fonte de alimentação e de renda para a população rural do Semi-Árido. Por se tratar de uma doença debilitante, a LC acarreta

perda de peso, redução da lactação e da eficiência reprodutiva dos animais infectados, e perda do valor comercial das peles. Assim, os prejuízos gerados por esta enfermidade são de considerável extensão, pois além de afetar uma cultura de subsistência básica para o pequeno produtor nordestino, traz grandes prejuízos para as indústrias de derivados da ovinocaprinocultura, devido à redução na produção de lã, carne e leite, e também à condenação das carcaças e peles dos animais infectados nos abatedouros (Aiello *et al.*, 1998; Williamson, 2001; Songer, 2005; Dorella *et al.*, 2009a).

1.1.2 Patogenia e imunologia

Ao invadir o hospedeiro, *C. pseudotuberculosis* é capturada localmente por células fagocíticas. Contudo, o processo de fagocitose é ineficiente, pois a bactéria resiste ao compartimento fagolisossoma dos macrófagos e continua a se multiplicar, causando a morte destes, e a conseqüente infecção de outros macrófagos. Essa incapacidade de eliminação da bactéria pode ser devido à presença da camada lipídica bacteriana, e à resistência da bactéria ao óxido nítrico produzido pelos macrófagos, o qual é um potente efector na eliminação de patógenos intracelulares (Bogdan *et al.*, 1997, Songer, 2005).

Com a morte das células do sistema imunológico, ocorre a liberação do microrganismo no linfonodo drenante local, ocasionando a formação de lesões necróticas (Jones *et al.*, 2000). Então, as bactérias iniciam um novo ciclo de replicação, conseguindo colonizar os linfonodos regionais, e podendo atingir diversos órgãos e células. Esta disseminação envolve a ação de outro determinante de virulência, a exotoxina fosfolipase D (Aiello *et al.*, 1998, Songer, 2005).

Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo ocorre a formação de granulomas. Microscopicamente, a lesão se inicia pelo aparecimento de células epitelióides que, posteriormente, são substituídas por necrose caseosa, sendo esta a característica predominante desta patologia. A massa caseosa vai sendo circundada por células epiteliais, linfócitos e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso; e à medida que a lesão progride, estas camadas celulares e fibróticas vão sofrendo necrose. Esse processo é crônico e se repete sucessivamente sobre a camada fibrosa, resultando no aspecto macroscópico desta patologia, o qual é caracterizado por uma massa esférica laminada, semelhante às camadas de uma cebola (Jones *et al.*, 2000).

As lesões se desenvolvem lentamente, de modo crônico, e freqüentemente ao longo de toda a vida do animal, sendo que bactérias viáveis podem ser encontradas

em abscessos anos após a infecção inicial. Também podem ocorrer reativações da doença, com o desenvolvimento de lesões em novos locais após um considerável período de aparente quiescência (Baird e Fontaine, 2007).

A formação de granulomas é um processo dependente da imunidade adaptativa que, nesse caso, é complexa e envolve tanto uma resposta imune humoral como mediada por linfócitos T (Paule, 2003; El-Enbaawy *et al.*, 2005). Pépin e cols. (1994) observaram que há mais linfócitos T CD8 em granulomas no sítio de inoculação em comparação com aqueles presentes em linfonodos drenantes. Esta subpopulação de linfócitos está relacionada com a atividade efetora e citotóxica, podendo atuar como um mecanismo de proteção antibacteriana para conter a disseminação de macrófagos infectados.

Diversas citocinas são expressas durante a infecção experimental, entre as quais se destacam a produção de IL-2 e IL-4 em linfonodos drenantes e de TNF- α e IFN- γ no sítio de inoculação. Estas citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento da resposta imune celular, sendo que o IFN- γ possui grande importância na ativação de macrófagos, os quais são os responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares (Pépin *et al.*, 1997). De acordo com Jolly (1965), a resolução da infecção por *C. pseudotuberculosis* está relacionada com a presença de macrófagos ativados dentro da lesão.

O papel da resposta imune humoral na proteção contra *C. pseudotuberculosis* foi demonstrado em ensaios de imunização passiva, nos quais a administração de soros antitoxina e antibactéria protegeram camundongos desafiados com a bactéria (Paule, 2003). Contudo, Irwin e Knight (1975) relataram que a proteção contra *C. pseudotuberculosis* é dependente de linfócitos T e está associada com a diminuição da resposta humoral, ressaltando-se a importância da imunidade mediada por células.

1.1.3 Epidemiologia

Essa enfermidade é prevalente em diversos países, como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, França, Itália, Argentina, Chile, Uruguai e Brasil (Arsenault *et al.*, 2003; Williamson, 2001; Dorella *et al.*, 2006a). No Brasil, estima-se que a maioria dos rebanhos esteja infectada e que a prevalência clínica possa atingir 30% dos animais. Os estados da Região Nordeste são os mais afetados, em razão de possuírem a maior concentração de rebanhos caprinos do país (Ribeiro *et al.*, 2001). No estado de Minas Gerais (Região Sudeste), que ainda possui um rebanho reduzido, mas que apresenta crescimento nas atividades de ovino e caprinocultura, a LC tem sido observada com alta frequência, principalmente nos

rebanhos da região norte do estado, onde 84,3% dos produtores relataram ter problemas decorrentes da patologia (Faria *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos realizados por nosso grupo de pesquisa indicaram que a prevalência da LC em Minas Gerais é de aproximadamente 75,8% entre ovinos (Guimarães, 2009) e 78,9% entre caprinos (Seyffert *et al.*, 2010).

A prevalência da doença apresenta variações quando se analisa o fator hospedeiro, sendo maior em ovinos do que em caprinos. Contudo, nas duas espécies, a patologia é mais observada em animais adultos, o que reflete uma maior exposição aos fatores de risco (Al-Rawashdeh *et al.*, 2000; Radostits *et al.*, 2002). Em ovinos, a raça Merinos e seus mestiços são as mais propensas a desenvolverem a doença, o que se deve à presença de uma pele mais fina apresentando dobras, o que propicia maiores lesões por ocasião da tosquia (Radostits *et al.*, 2002).

C. pseudotuberculosis é um patógeno que pode infectar diferentes espécies, incluindo eqüinos e bovinos (causando linfangite ulcerativa), camelos, lhamasju, búfalos e humanos (Peel *et al.*, 1997; Selim, 2001; Williamson, 2001; Yeruham *et al.*, 2004). A infecção humana causada por *C. pseudotuberculosis* é um evento raro, mas demonstra o potencial zoonótico desta bactéria. A maioria dos casos relatados em seres humanos envolveu o contato direto com animais doentes ou a exposição a produtos animais contaminados, sendo a doença geralmente associada a atividades profissionais. Já foram relatados aproximadamente 25 casos de infecção em humanos com este microrganismo (Mills *et al.*, 1997; Peel *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2005), sendo que a sintomatologia envolve a presença de linfadenite e de abscessos nos nódulos linfáticos (Peel *et al.*, 1997). O tratamento apenas com antibióticos sistêmicos geralmente é ineficaz, de modo que a maioria dos casos também requer a excisão cirúrgica do linfonodo afetado (Baird e Fontaine, 2007).

1.1.4 Transmissão

As fontes de infecção consistem nas secreções dos linfonodos superficiais, que se abscedam e se rompem, e nas secreções nasal e bucal dos animais com abscessos pulmonares, que drenam para a árvore brônquica (Radostits *et al.*, 2002). A transmissão da LC ocorre através do contato direto entre os animais durante o confinamento, ou indiretamente através de materiais contaminados com secreções infectantes (Scott, 2007). A entrada da bactéria no organismo é facilitada pela presença de feridas na pele; contudo, ela pode penetrar até mesmo pela pele intacta (Williamson, 2001). Entre pequenos ruminantes, o microrganismo é transmitido principalmente 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 e espinhos (Alves e Pinheiro, 1997).

A transmissão e a disseminação de *C. pseudotuberculosis* estão relacionadas com as condições ambientais encontradas nas criações dos animais (Augustine e Renshaw, 1986; Yeruham *et al.*, 2004). Esta bactéria é resistente em temperaturas baixas e locais úmidos, podendo sobreviver por oito meses no solo, por quatro meses em galpões de tosquia e por dois meses em feno e materiais contaminados (Radostits *et al.*, 2002).

Os principais fatores de risco incluem a falta de higiene das instalações, o contato direto entre animais infectados, a poeira, os banhos e a tosquia (Radostits *et al.*, 2002). Na caprino e ovinocultura brasileiras, um importante fator de risco é a vegetação do Nordeste brasileiro, caracterizada pela presença de espinhos que podem provocar lesões na pele dos animais (Alves e Pinheiro, 1997). Em bovinos e bufalinos, há evidências de transmissão da bactéria por mosca doméstica e por outros dípteros (Yeruham *et al.*, 1996; Selim, 2001; Yeruham *et al.*, 2004)

1.1.5 Tratamento

O tratamento da doença pode ser realizado através do uso de antibióticos. Contudo, esta não é considerada uma estratégia viável, pois possui um custo elevado, e apesar da bactéria ser sensível a vários tipos de antibióticos *in vitro*, estes não são capazes de penetrar na cápsula dos abscessos, o que torna a terapia ineficiente (Aiello *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 2002). Como alternativa, temos a drenagem e a extirpação dos linfonodos superficiais acometidos, as quais além de não eliminarem 100% das bactérias, não são viáveis quando linfonodos e órgãos internos estão acometidos (Alves e Pinheiro, 1997). Além disso, estes métodos podem acarretar a contaminação do ambiente com o patógeno, sendo que a quantidade de bactérias liberada por um único abscesso é capaz de contaminar todo o rebanho. Portanto, a melhor estratégia para combater a doença é a profilaxia (Piontkowski e Shivers, 1998).

1.1.6 Profilaxia

A primeira medida de controle se baseia em procedimentos de manejo, cujo objetivo é evitar a disseminação da bactéria. Todos os instrumentos de uso comunitário devem ser mergulhados em um desinfetante potente após contato com

cada animal. Galpões, troncos de tosquia e baias de contenção devem ser bem higienizados e desinfetados (Alves e Pinheiro, 1997). A tosquia deve ser iniciada pelos animais mais jovens, evitando contato entre eles e os demais. Os animais que possuem lesões palpáveis devem ser manipulados por último, as feridas na pele devem ser desinfetadas e agentes bactericidas devem ser adicionados à água utilizada no banho. Na aquisição dos animais, deve-se levar em consideração o histórico livre da patologia, e deve-se realizar a quarentena dos mesmos (Radostits *et al.*, 2002; Scott, 2007).

Outras medidas profiláticas mais drásticas também são sugeridas, como o sacrifício dos animais que apresentem lesões aparentes ou que sejam soropositivos em testes diagnósticos. Contudo, estes testes podem gerar resultados falso-positivos, levando a eliminação de animais não infectados (Radostits *et al.*, 2002; Menzies *et al.*, 2004).

Assim, o controle da LC deve ser baseado em medidas que impeçam a entrada e a disseminação do microrganismo nos rebanhos, sendo que a melhor estratégia consiste na vacinação dos animais saudáveis, juntamente com a identificação e eliminação dos animais infectados. Para isso, é necessário o desenvolvimento de vacinas e de testes diagnósticos eficazes, já que ainda não existe uma imunoprofilaxia ideal para o combate a esta doença. (Piontkowski e Shivvers, 1998; Paton *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006a).

1.1.6.1 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da LC superficial é baseado na cultura bacteriológica seguida por identificação bioquímica de isolados, o qual consiste no padrão-ouro. O teste bioquímico bem estabelecido para identificação de bactérias corineformes é o sistema API Coryne (APIbioMérieux, Inc., La Balme lès Grottes, France), o qual consiste em uma bateria de 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48 horas. Assim, o desenvolvimento de um método mais rápido e mais específico para detectar *C. pseudotuberculosis* pode ser de grande valor no diagnóstico da LC.

Cetinkaya e cols. (2002) propuseram um teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar isolados de *C. pseudotuberculosis* através da amplificação parcial da seqüência do gene que codifica o RNA ribossômico 16S. No entanto, o teste apresentou limitações, incluindo a incapacidade de distinguir a bactéria *C. ulcerans* e a dependência de cultivo bacteriano prévio.

A amplificação de múltiplos *loci* em uma mesma reação de PCR tem sido uma estratégia amplamente utilizada para a detecção de patógenos, por permitir a

identificação altamente específica do microrganismo de interesse com grande economia de tempo e de reagentes. Assim, nosso grupo de pesquisa na UFMG desenvolveu uma nova metodologia, baseada em uma reação de PCR multiplex (mPCR), para amplificar simultaneamente, seqüências de três genes específicos de *C. pseudotuberculosis*: *16S rDNA* (RNA ribossômico 16S), que é o gene de escolha na maioria dos estudos de taxonomia bacteriana; *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), um gene que vem sendo amplamente utilizado em análises filogenéticas de microrganismos dos gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium*; e *pld* (fosfolipase D), que codifica uma exotoxina associada com a virulência de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* e *Arcanobacterium haemolyticum*. Através da utilização deste teste de mPCR associado a um método de extração de DNA bacteriano diretamente do material purulento, foi possível detectar *C. pseudotuberculosis* mais rapidamente e de modo tão específico quanto a cultura bacteriológica seguida por identificação bioquímica dos isolados, que é considerado pelo Centro Nacional de Referência em Corynebacterioses, localizado no Instituto Pasteur, o padrão-ouro para o diagnóstico da LC (Pacheco *et al.*, 2007). Contudo, este método não é capaz de identificar o microrganismo em amostras sorológicas.

Nos últimos anos, diversos testes sorológicos foram desenvolvidos na tentativa de superar o problema do diagnóstico subclínico da LC, incluindo o teste de soroprecipitação (Awad, 1960), a imunodifusão em gel (Burrel, 1980b; Nain *et al.*, 1984), a hemaglutinação indireta (Shigidi, 1978), a fixação do complemento (Shigidi, 1979), a inibição da hemólise (Burrel, 1980a) e diferentes ensaios de ELISA, como ELISAs indiretos utilizando várias preparações da célula bacteriana, proteínas secretadas e a toxina de *C. pseudotuberculosis* (Binns *et al.*, 2007; Dercksen *et al.*, 2000; Carminatti *et al.*, 2003), ELISA sanduíche com PLD (Ter Laak *et al.*, 1992; Dercksen *et al.*, 2000) e ELISA para detectar interferon gama (IFN- γ) como um marcador de imunidade mediada por células contra *C. pseudotuberculosis* (Menzies *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2002). Contudo, a maioria destes testes não possui sensibilidade e especificidade suficientemente satisfatórias, e não permite a diferenciação entre os animais infectados e os vacinados.

1.1.6.2 Vacinas

Como o tratamento da LC é de alto custo e ineficaz, a medida que apresenta melhor custo-benefício contra a doença é a imunização, porém ainda não existe uma vacina eficiente e protetora contra *C. pseudotuberculosis*. Assim, a busca por uma vacina ideal contra a LC, que forneça uma proteção de longa duração, sem provocar

reações adversas, e que permita a diferenciação entre animais vacinados e infectados, tem sido uma prioridade (Dorella *et al.*, 2009). Para isso, diferentes estratégias vacinais têm sido testadas, como o uso de bactérias atenuadas e mortas (Brogden *et al.*, 1990; LeaMaster *et al.*, 1987; Simmons *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1998), frações contendo antígenos da parede bacteriana (Braga, 2007), sobrenadantes da cultura bacteriana (Eggleton *et al.*, 1991; Ellis *et al.*, 1991), proteínas recombinantes (Fontaine *et al.*, 2006; Hodgson *et al.*, 1999; Tachedjian *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2000), vacinas de DNA (Chaplin *et al.*, 1999) e uma mistura de componentes celulares e sobrenadantes (El-Enbaawy *et al.*, 2005; Braga, 2007). Essas preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais, e até mesmo naturais; contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis.

1.1.6.2.1 Vacinas comerciais

A maioria das vacinas comercialmente disponíveis se baseia em sobrenadantes de cultura celular inativados combinados com antígenos de outros patógenos, tais como *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringes*, *Clostridium novyi* e *Clostridium chavoei*. Estas vacinas possuem a exotoxina fosfolipase D inativada como principal componente, consistindo em vacinas de toxóide. No entanto, elas não possuem uma eficácia satisfatória contra *C. pseudotuberculosis* (Piontkowski e Shivers, 1998; Standford *et al.*, 1998; Williamson, 2001).

No Brasil, uma vacina viva atenuada produzida a partir da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, foi licenciada em 2000 e vem sendo industrializada, em versão líquida e liofilizada, pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola. Esta vacina se baseia em uma linhagem isolada em 1971, que apresenta naturalmente uma baixa virulência (<http://www.ebda.ba.gov.br>). Entretanto, esta vacina não vem apresentando o mesmo sucesso em testes de campo, sendo bastante variável o nível de proteção obtida.

As vacinas atualmente disponíveis apresentam aspectos relevantes a serem considerados quanto à sua utilização. Nem todas as vacinas licenciadas para ovinos têm a mesma eficiência para caprinos, sendo normalmente necessário ajustar o programa de vacinação a cada caso (Williamson, 2001). Além disso, a ineficácia do processo de imunização pode estar associada ao uso incorreto das vacinas pelos criadores (Paton *et al.*, 2003).

1.1.6.2.2 Vacinas experimentais

Foi construída uma linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis* através da introdução de uma mutação no gene *aroQ*, o qual codifica um produto que participa da biossíntese de aminoácidos aromáticos. Esta linhagem ofereceu proteção contra o desafio experimental com a bactéria em modelo murino; contudo, o mesmo resultado não foi obtido em ovinos (Simmons *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1998).

A estratégia de mutagênese sítio-específica foi empregada por Hodgson e cols. (1992) para a construção de um mutante PLD-negativo de *C. pseudotuberculosis* (Toxminus). Esta linhagem atenuada foi capaz de estimular as respostas humoral e celular, contudo o nível de proteção obtido não foi satisfatório. Uma linhagem de Toxminus expressando uma forma inativada da PLD foi construída por Hodgson e cols. (1994), entretanto, esta linhagem também não forneceu um nível de proteção adequado.

Anticorpos com alta especificidade, produzidos por células secretoras de anticorpos (CSA), obtidos de infecções induzidas em ovinos, foram usados como sondas para a procura de antígenos de *C. pseudotuberculosis* através da técnica de *Immunoblot*. Deste modo, foi reconhecido o antígeno CP40, uma protease secretada de 40 kilodaltons (Wilson *et al.*, 1995). Testes de ELISA confirmaram os resultados obtidos com o *immunoblot* e ensaios em campo com este antígeno semi-purificado mostraram que CP40 é altamente protetora contra LC induzida experimentalmente, sendo uma possível candidata ao desenvolvimento de vacinas (Walker *et al.*, 1994). Da mesma forma, a proteína do choque térmico Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* vem sendo testada quanto ao seu potencial como antígeno vacinal (Coelho, 2007). Embora muitos outros componentes imunogênicos secretados-excretados tenham sido encontrados usando a técnica de *immunoblot* (Paule *et al.*, 2003; Paule *et al.*, 2004), essas proteínas ainda não foram caracterizadas, o que dificulta a sua utilização.

Chaplin e cols. (1999) construíram e testaram uma versão inativada de PLD apresentada em vacina de DNA na imunização de ovinos. Esta ainda expressava o domínio extracelular de CTLA-4, que se liga com alta afinidade à molécula coestimulatória B7 das células apresentadoras de antígeno, com a função de aumentar a resposta humoral. O resultado foi de uma proteção parcial contra o desafio experimental de *C. pseudotuberculosis*, sendo similar ao obtido pela vacina de subunidade inativada por formalina contra LC em ovinos.

Recentemente, Dorella e cols. (2006a) identificaram 34 mutantes de *C. pseudotuberculosis* por meio de mutagênese aleatória, utilizando o sistema de transposição baseado no TnFuZ. Este sistema de transposição foi útil para a

identificação de genes que codificam proteínas exportadas, como subunidades fimbriais e adesinas, as quais estão provavelmente envolvidas diretamente com os processos de entrada e sobrevivência da bactéria nas células hospedeiras, contribuindo para a sua virulência (Dorella *et al.*, 2006b). Ensaio de imunização permitiram selecionar um desses mutantes (Cp13) como um candidato promissor para o desenvolvimento de uma nova vacina viva atenuada contra a LC (Dorella, 2009). O mutante Cp13 foi capaz de conferir 81% de proteção contra a infecção pela bactéria selvagem em camundongos, superando o nível de proteção oferecido pela vacina Glanvac-3 (Pfizer®), comercializada e amplamente utilizada na Austrália (Dorella, 2009). A linhagem Cp13 foi patenteada e nosso grupo de pesquisa na UFMG está realizando testes-piloto com esta linhagem em caprinos e ovinos para verificar se ela garante os mesmos níveis de proteção obtidos nos murinos quando desafiados com a linhagem selvagem.

1.2 O gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* é classificado no grupo das actinobactérias, denominado CMN, do qual também fazem parte os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. As espécies deste grupo possuem algumas características em comum, como a organização específica da parede celular, composta principalmente de peptidoglicano, arabinogalactano e ácido micólico, e o alto conteúdo G + C do genoma (47-74%) (Coyle e Lipsky, 1990; Songer, 2005; Dorella *et al.*, 2006a).

1.3 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

C. pseudotuberculosis é o agente etiológico da linfadenite caseosa, também conhecida como mal do carço, pseudotuberculose e enfermidade de Preiz-Nocard, que acomete populações de pequenos ruminantes em todo o mundo, causando significativas perdas econômicas (Paton *et al.*, 2003; Williamson *et al.*, 2001). Essa bactéria foi descrita pela primeira vez em 1888, a partir de um caso de linfangite em bovino, pelo veterinário francês Edmond Nocard. Em 1891, Hugo Von Preisz isolou uma bactéria similar de um abscesso renal de ovino, originando o nome “bacilo de Preisz-Nocard” (Merchant e Packer, 1967; Collett *et al.*, 1994). A linfadenite caseosa foi descrita pela primeira vez na Austrália em 1934 por Churchward (Collett *et al.*, 1994), sendo que atualmente, este é o segundo país, depois da China, com o maior rebanho ovino do mundo.

1.3.1 Aspectos microbiológicos

C. pseudotuberculosis é um patógeno Gram-positivo intracelular facultativo que exibe formas pleomórficas, que variam desde cocóides a bastões filamentosos medindo cerca de 0,5 µm a 0,6 µm por 1,0 µm a 3,0 µm de tamanho (Buxton e Frasier, 1977; Connor *et al.*, 2000; Merchant e Packer, 1967). Grânulos metacromáticos são distintamente observados nas formas bacilares, mas estão ausentes nas células cocóides. Esta bactéria não possui cápsula, não esporula, é imóvel e possui fímbrias (Buxton e Frasier, 1977; Hard, 1969; Merchant e Packer, 1967). É anaeróbia facultativa e possui condições ótimas de crescimento a 37°C em pH entre 7.0 e 7.2 (Buxton e Frasier, 1977; Merchant e Packer, 1967). Tem um crescimento inicialmente espaçado na superfície do ágar e, posteriormente, se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme alaranjado. O crescimento em meio líquido desenvolve-se como depósitos granulares, com uma película na superfície (Buxton e Frasier, 1977; Merchant e Packer, 1967; Muckle e Gyles, 1982). A hemólise em ágar-sangue é variável, sendo intensificada na presença de *Rhodococcus equi* (Buxton e Frasier, 1977; Quinn *et al.*, 2005). A toxina de *C. pseudotuberculosis* inibe a ação da beta-hemolisina estafilocócica. (Quinn *et al.*, 1994; Biberstein e Hirsh, 2003).

1.3.2 Propriedades bioquímicas

A parede celular de *C. pseudotuberculosis* apresenta peptideoglicano baseado no ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP) e os açúcares arabinose e galactose estão presentes em grandes quantidades, assim como cadeias curtas de ácido micólico. (Jolly, 1965; Puech *et al.*, 2001). As reações bioquímicas de isolados de *C. pseudotuberculosis* variam consideravelmente, principalmente quanto a suas habilidades de fermentação. Todas as linhagens produzem ácido, mas não gás, a partir de muitas fontes de carbono, incluindo glicose, frutose, galactose, manose e sacarose (Merchant e Packer, 1967; Buxton e Fraser, 1977; Holt *et al.*, 1994). A bactéria é fosfolipase D e catalase positiva, oxidase negativa e beta-hemolítica (Buxton e Fraser, 1977; Anderson *et al.*, 2004).

1.3.3 Taxonomia

Inicialmente, a classificação taxonômica de *C. pseudotuberculosis* foi realizada a partir de características morfológicas e bioquímicas (Muckle e Gyles, 1982). Biberstein e cols. (1971) utilizaram a produção de nitrato redutase para distinguir o

biovar *equi* (isolado de eqüinos e bovinos; redução de nitrato positiva) do biovar *ovis* (isolado de ovinos e caprinos; redução de nitrato negativa). Foi sugerida uma relação próxima entre *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* devido ao fato desses organismos serem os únicos entre as corinebactérias a produzirem fosfolipase D (Groman *et al.*, 1984; Buck *et al.*, 1985). Além disso, algumas linhagens de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* podem produzir a toxina diftérica, e outras linhagens não-toxigênicas podem ser convertidas em toxigênicas quando lisogenizadas por fagos β de *C. diphtheriae* produtora de toxina (Buck *et al.*, 1985; Cianciotto e Groman, 1985; Cianciotto *et al.*, 1986; Groman *et al.*, 1984).

Métodos moleculares, incluindo hibridização de ácidos nucléicos e análises de seqüências do gene *16S rDNA* foram utilizados para determinar o grau de relação entre diferentes espécies e linhagens de corinebactérias (Riegel *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 1997; Khamis *et al.*, 2005). Dois estudos independentes concluíram que *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* estão proximamente relacionadas (Hou *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1997). Riegels e cols. (1995) concluíram ainda que os biovares *equi* e *ovis* de *C. pseudotuberculosis* não devem ser classificados como subespécies, devido à sua grande similaridade genômica. Recentemente, foi verificado que análises de seqüências do gene *rpoB* são mais precisas do que aquelas baseadas no gene *16S rDNA* para a identificação de espécies de corinebactérias (Khamis *et al.*, 2004; Khamis *et al.*, 2005). Contudo, vários autores sugerem que os dois métodos devem ser complementares em estudos filogenéticos de espécies de *Corynebacterium* e *Mycobacterium* (Mollet *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Khamis *et al.*, 2004; Khamis *et al.*, 2005).

1.3.4 Suscetibilidade antimicrobiana

Os padrões de suscetibilidade de *C. pseudotuberculosis* a agentes antimicrobianos são muito variados, dependendo da fonte onde o isolado foi obtido. Geralmente ela é susceptível a ampicilina, cloranfenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina G e sulfametoxazol-trimetoprim. (Muckle e Gyles, 1982). A concentração inibitória mínima (CIM) para todos os isolados é similar para os vários agentes antimicrobianos, porém a resistência a antibióticos difere quando a bactéria se encontra em determinadas condições infecciosas. Fernández e cols. (2001) encontraram altos valores de CIM para vários agentes antimicrobianos em uma análise de corinebactérias isoladas de mastite em ovelhas. Olson e cols. (2002) relataram que *C. pseudotuberculosis* é altamente resistente a qualquer droga quando há a formação de biofilme.

1.3.5 Fatores de virulência

Há pouco conhecimento sobre os mecanismos moleculares e as bases genéticas da virulência em *C. pseudotuberculosis*. Apenas dois fatores de virulência são bem caracterizados: a exotoxina da fosfolipase D e os lipídeos tóxicos da parede celular.

1.3.5.1 Fosfolipase D

A fosfolipase D (PLD) é uma potente exotoxina produzida por *C. pseudotuberculosis* e é considerada o principal fator de virulência desta bactéria (Lipsky *et al.*, 1982; Hodgson *et al.*, 1999). Foi isolada pela primeira vez em *C. pseudotuberculosis* por Carne (1940), e deste então, tem sido detectada em todas as linhagens isoladas deste microrganismo (Songer *et al.*, 1988). É um fator de permeabilidade que promove a hidrólise de ligações éster na esfingomiéline de células de mamíferos (Carne e Onon, 1978; Coyle e Lipsky, 1990; Hodgson *et al.*, 1990; McNamara *et al.*, 1995), contribuindo para a dispersão da bactéria do sítio inicial de infecção para sítios secundários dentro do hospedeiro, já que o uso de uma antitoxina previne a disseminação de *C. pseudotuberculosis* (Williamson, 2001). Além disso, a vacinação de cabras com exotoxina inativada também é capaz de prevenir a disseminação da bactéria após desafio experimental (Brown *et al.*, 1986). O papel da PLD na virulência da bactéria ficou evidente após a geração de mutantes, nos quais o gene *pld* foi inativado do cromossomo, através de mutagênese sítio-específica. Estes mutantes são incapazes de se disseminar e induzir o desenvolvimento da linfadenite caseosa; e além disso, eles induzem uma resposta imunológica protetora, embora não totalmente satisfatória contra *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1992).

Sabe-se que a PLD atua na permeabilidade dos vasos linfáticos e sanguíneos e como uma hemolisina que tem ação necrosante. A disseminação da bactéria por ação da PLD pode ser explicada pela ação dermonecrótica que a mesma exerce danificando as células endoteliais. Isto promove o extravasamento de plasma dos pequenos vasos sanguíneos da derme, e então, o acesso aos vasos linfáticos (Egen *et al.*, 1989; Songer, 1997). Além disso, essa exotoxina é considerada leucotóxica, o que contribui para as lesões e a destruição de macrófagos de caprinos durante a infecção com *C. pseudotuberculosis* (Tashjian e Campbell, 1983). O gene *pld* de *C. pseudotuberculosis* já foi clonado, seqüenciado e expresso em *Escherichia coli* e tem sido alvo de intensos estudos. Ele codifica uma proteína de 31,4 kilodaltons e está

presente no genoma de *C. pseudotuberculosis* em cópia única (Egen *et al.*, 1989; Hodgson *et al.*, 1990; McNamara *et al.*, 1995; Songer *et al.*, 1990)

1.3.5.2 Lipídeos tóxicos da parede celular

Os lipídeos de superfície de *C. pseudotuberculosis* foram descritos há muito tempo como importantes fatores para a patogênese da doença (Hard, 1972). Segundo Jolly (1966), as linhagens mais virulentas possuem mais lipídeos do que as linhagens atenuadas. Esta camada lipídica representa uma proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos, além de permitir a aderência dos microrganismos e promover uma citotoxicidade local (Radostits *et al.*, 2002). Além disso, esta camada permite a sobrevivência da bactéria por longos períodos no meio ambiente (Baird e Fontaine, 2007). A toxicidade do material lipídico extraído foi demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias (Jolly, 1966) e, segundo Muckle e Gyles (1982), há uma relação direta entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de abscessos crônicos.

1.3.5.3 Novos candidatos

Recentemente, foi demonstrado que quatro genes presentes em um operon, designados *fag A*, *B*, *C* e *D*, têm um papel na virulência de *C. pseudotuberculosis*. Estes genes estão situados próximos ao gene *pld* no genoma da bactéria, e estão envolvidos com a absorção de ferro. Considerando que *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular, esta bactéria deve ser capaz de adquirir ferro em um ambiente onde este nutriente é escasso. Embora não houvesse alteração na utilização de ferro por um mutante de *fag B(C)* *in vitro*, este teve uma habilidade diminuída para sobreviver e causar abscessos em cabras infectadas experimentalmente (Billington *et al.*, 2002).

Atualmente, a pesquisa por fatores de virulência em diversos agentes patogênicos tem dedicado grande atenção às proteínas reguladoras da expressão gênica (Kazmierczak *et al.*, 2005). Isto se deve ao fato de que patógenos intracelulares, como *C. pseudotuberculosis*, precisam se adaptar a diferentes condições ambientais durante o curso da infecção, além de resistir à resposta adaptativa do hospedeiro. Especificamente, *C. pseudotuberculosis* pode sobreviver às condições adversas do meio ambiente por até oito meses antes de infectar um organismo hospedeiro (Baird e Fontaine, 2007). Durante o processo infeccioso, esta bactéria ainda é exposta a vários ambientes diferentes, desde o ponto de entrada no

hospedeiro, passando pelo sistema linfático e a replicação no interior de macrófagos, até o estabelecimento de lesões dentro dos órgãos (McKean *et al.*, 2007a; 2007b). Diferentemente de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* e *Brucella abortus*, *C. pseudotuberculosis* não impede a fusão entre o fagossomo e o lisossomo nos macrófagos (Tashjian e Campbell, 1983). Ao invés disso, esta bactéria é capaz de resistir ao ambiente extremamente hostil do fagolisossomo, caracterizado pela presença de baixo pH, alta atividade proteolítica e grande potencial oxidativo, e ainda mata as células fagocíticas infectadas dentro de poucas horas (Tashjian e Campbell, 1983; Rohde *et al.*, 2007; McKean *et al.*, 2007b). Certamente, mudanças na expressão gênica desempenham um papel importante nas adaptações e modificações necessárias para o desenvolvimento de uma infecção bem-sucedida por este patógeno.

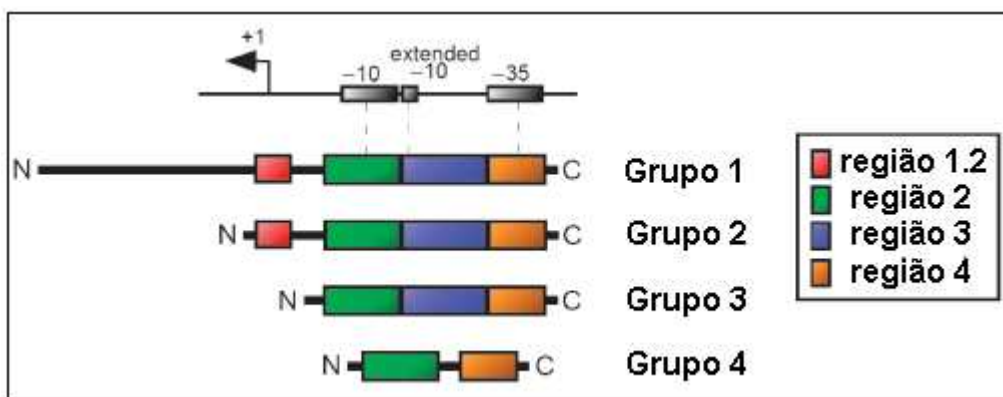
1.4 Fatores *sigma* bacterianos

Os fatores *sigma* (σ) consistem em subunidades dissociáveis da RNA polimerase bacteriana, que são responsáveis pelo reconhecimento de promotores gênicos específicos. O cerne da RNA polimerase bacteriana, denominado RNAP, é constituído por cinco subunidades (α_2 , β , β' e ω). Este cerne não apresenta afinidade específica pelo DNA, sendo necessário que ele se associe a um fator σ , originando a holoenzima RNA polimerase, para que ocorra o reconhecimento dos promotores gênicos e a ativação da transcrição de forma específica (Helmann, 2002; Paget e Helmann, 2003; Sachdeva *et al.*, 2009). Portanto, os fatores *sigma* funcionam como reguladores globais que asseguram a expressão coordenada de conjuntos gênicos (*regulons*) fisiologicamente relacionados (Nesvera e Pátek, 2008).

Uma vez que o *regulon* de um único fator *sigma* pode ser compreendido por centenas de genes, os fatores *sigma* proporcionam mecanismos efetivos para a regulação simultânea da expressão de vários genes bacterianos. Em alguns casos, os genes que compreendem o *regulon* de um fator *sigma* possuem uma função primária claramente definida, como os genes regulados pelos fatores σ de esporulação em *Bacillus subtilis*; em outros, os genes que compreendem um *regulon* podem contribuir para funções múltiplas da fisiologia do organismo, como os genes expressos na fase estacionária e os genes de resposta geral ao estresse regulados pelo fator σ^B de *Listeria monocytogenes* (Helmann, 2002; Kazmierczak *et al.*, 2005).

Os fatores *sigma* podem ser divididos em duas famílias filogeneticamente distintas relacionadas ao σ^{54} ou ao σ^{70} de *E. coli*. Os membros da família σ^{54} são relativamente raros e não são encontrados nas bactérias Gram-positivas que possuem

o genoma rico em G + C, como *Mycobacterium* e *Corynebacterium* (Sachdeva *et al.*, 2009). Na maioria das espécies que possuem o fator σ^{54} , este é denominado σ^N e freqüentemente 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 célula-célula e a tolerância ao zinco (Kazmierczak *et al.*, 2005; Potvin *et al.*, 2007). Já os membros da família σ^{70} são encontrados em todas as bactérias (Sachdeva *et al.*, 2009). Os fatores *sigma* relacionados ao σ^{70} podem apresentar até quatro regiões conservadas (regiões 1, 2, 3 e 4), as quais podem ser divididas em subregiões (figura 1.1). A região 1 está localizada na porção amino-terminal e contém as subregiões 1.1 e 1.2. A subregião 1.1 apresenta carga negativa e tem sido relacionada com a inibição da ligação dos fatores *sigma* livres ao DNA. A região 2 é composta por quatro subregiões, sendo que a subregião 2.4 é necessária para o reconhecimento da região promotora -10. A região 3 é compreendida pelas subregiões 3.0, 3.1 e 3.2. A subregião 3.0 está envolvida com o reconhecimento de elementos promotores -10 estendidos. Finalmente, a região 4 possui as subregiões 4.1 e 4.2, sendo que a subregião 4.2 é responsável pelo reconhecimento da região promotora -35 e pela interação com vários ativadores transcricionais. Todas as regiões contribuem, embora em diferentes extensões, para a ligação do fator *sigma* a RNA polimerase (Rodrigue *et al.*, 2006).



Adaptado: Rodrigue *et al.*, 2006.

Figura 1.1 – Representação esquemática das regiões conservadas dos fatores *sigma* dos grupos 1, 2, 3 e 4 e das regiões promotoras que elas reconhecem.

Os fatores *sigma* relacionados ao σ^{70} podem ser divididos em quatro grupos de acordo com suas características estruturais e fisiológicas (figura 1.1). O grupo 1 é composto pelos fatores *sigma* principais ou primários, os quais são essenciais para a sobrevivência das bactérias e apresentam todas as quatro regiões conservadas (Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009). Estes fatores *sigma* são responsáveis

pela ativação da transcrição da maioria dos genes essenciais ao crescimento exponencial em meio mínimo, sob condições ótimas de cultivo (genes *housekeeping*) (Halgasova *et al.*, 2002). Os fatores *sigma* do grupo 2 são encontrados em um número limitado de espécies de bactérias (*Proteobacteria*, *Cyanobacteria* e bactérias Gram-positivas que possuem o genoma rico em G + C) e são proximamente relacionados aos fatores *sigma* do grupo 1, embora não sejam essenciais para a sobrevivência das bactérias e não apresentem a subregião 1.1. Os fatores *sigma* do grupo 2 mais bem caracterizados estão envolvidos na transcrição de genes de resposta geral ao estresse e de sobrevivência na fase estacionária. Os fatores *sigma* do grupo 3 também possuem as regiões conservadas 2, 3 e 4, mas estão distantemente relacionados aos fatores *sigma* do grupo 1. Os fatores *sigma* do grupo 3 compreendem proteínas evolucionariamente relacionadas que possuem funções similares, como resposta ao estresse térmico, esporulação ou biossíntese de flagelo. O grupo 4 corresponde ao maior e mais heterogêneo grupo de fatores *sigma*. Os membros deste grupo, também descritos como fatores *sigma* de função extracitoplasmática (ECF), contém apenas as regiões conservadas 2 e 4. Embora a função de muitos dos fatores *sigma* deste grupo ainda seja desconhecida, eles estão freqüentemente envolvidos em condições de resposta ao estresse, como limitação de ferro, estresse oxidativo e estresse de superfície celular. Além disso, muitos destes fatores *sigma* são importantes para a virulência das bactérias (Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009).

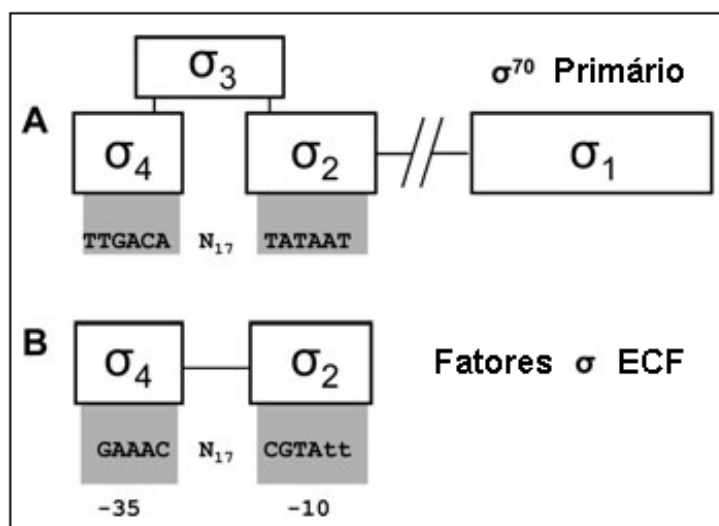
As eubactérias possuem pelo menos um fator *sigma* principal ou primário, pertencente à família σ^{70} , ativador da transcrição da maioria dos genes *housekeeping* (Halgasova *et al.*, 2002). Por exemplo, o fator σ^A de *B. subtilis* e o fator σ^{70} codificado pelo gene *rpoD* de *E. coli* são fatores *sigma* reguladores da transcrição de genes essenciais às respectivas espécies. Por outro lado, a exposição a determinados estímulos ambientais pode alterar a transcrição gênica através de um mecanismo no qual a subunidade σ primária ligada ao cerne da RNA polimerase é substituída por um fator *sigma* alternativo (Helmann, 2002; Kazmierczak *et al.*, 2005).

1.4.1 Fatores *sigma* alternativos

A maioria dos fatores *sigma* alternativos estão estruturalmente relacionados à família σ^{70} , e podem ser divididos em três classes: fatores σ ativadores de mecanismos gerais de resposta ao estresse, os quais apresentam grande similaridade estrutural com os fatores σ primários; fatores σ envolvidos principalmente nas alterações morfológicas do organismo, como a formação de flagelos e a esporulação; fatores σ de função extracitoplasmática (ECF), os quais estão envolvidos na ativação

de mecanismos de adaptação às mudanças que ocorrem no periplasma e na membrana da bactéria e no ambiente extracelular (Kazmierczak *et al.*, 2005; Potvin *et al.*, 2008).

Os fatores *sigma* primários possuem todos os quatro domínios distintos típicos das proteínas σ^{70} , designados σ^1 , σ^2 , σ^3 e σ^4 . Já os fatores *sigma* ECF apresentam apenas os domínios σ^2 e σ^4 , os quais são necessários para a interação com o cerne da RNA polimerase e para o reconhecimento dos promotores bacterianos. Ao contrário das seqüências consenso clássicas dos promotores bacterianos reconhecidos pelos fatores *sigma* primários, as regiões -35 ('TTGACA') e -10 ('TATAAT'), muitos dos promotores reconhecidos pelos fatores *sigma* ECF são caracterizados pela presença do motivo altamente conservado 'AAC' na região -35 e de um agrupamento de trinucleotídeos 'CGT' na região -10 (figura 1.2) (Helman, 2002; Starón *et al.*, 2009).



Adaptado: Starón *et al.*, 2009

Figura 1.2 – Domínios dos fatores *sigma* primários (A) e dos fatores *sigma* ECF (B) e seqüências consenso das regiões promotoras -35 e -10 reconhecidas por eles.

A região -35 dos promotores reconhecidos por diferentes fatores *sigma* ECF é bastante conservada, o que sugere que estes fatores *sigma* apresentam uma especificidade promotora muito semelhante. Por outro lado, a região -10 destes promotores apresenta uma maior variabilidade, o que pode ser explicado pelo baixo grau de similaridade entre as subregiões 2.4 dos diferentes fatores *sigma* ECF. Assim, acredita-se que a especificidade promotora individual dos diferentes fatores *sigma* ECF seja determinada pela região 2, que é responsável pelo reconhecimento da região promotora -10, já que esta região é menos conservada entre estes fatores do

que a região 4, que reconhece a região promotora -35. Isto pode contribuir para a coexistência de múltiplos membros da classe de fatores *sigma* ECF em uma mesma espécie, os quais podem regular diferentes grupos de genes (Missiakas e Raina, 1998, Raivio e Silhavy, 2001).

Um dos primeiros fatores *sigma* alternativos identificados foi o fator σ^B de *B. subtilis*, o qual pertence à família σ^{70} e possui domínios protéicos similares aos dos fatores *sigma* primários. A expressão gênica global de linhagens de *Corynebacterium glutamicum* deficientes e proficientes para o fator σ^B foi avaliada pelo emprego da técnica de microarranjo de DNA. Após uma análise detalhada dos genes mais fortemente ativados por este regulador transcricional, foi observada a presença de seqüências consenso a -10 nos promotores destes genes idênticas as dos genes *housekeeping* (Nesvera e Pátek, 2008). Isto sugere que o fator σ^B deve funcionar como uma proteína reguladora reserva, já que ele é capaz de ativar a transcrição de genes cujos promotores são similares aos reconhecidos pelo fator σ^A .

Vários estudos têm demonstrado que o fator σ^B está relacionado a mecanismos gerais de resposta ao estresse. O fator σ^B de *B. subtilis* é responsável pela regulação da transcrição de 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* (Larisch *et al.*, 2007; Nesvera e Pátek, 2008). Várias evidências ainda sugerem que fator σ^B de *C. glutamicum* está envolvido na resposta aos estresses ácido, osmótico, alcoólico e térmico, sendo o gene *sigB* provavelmente regulado por um fator *sigma* ECF (Nesvera e Pátek, 2008).

Enquanto o fator σ^B participa da ativação de mecanismos gerais de resposta ao estresse nas bactérias Gram-positivas, como *B. subtilis*, *L. monocytogenes* e *M. tuberculosis*, o fator σ^S desempenha função semelhante nas bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, *Salmonella enterica* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o fator σ^S participa da ativação de vários genes necessários para a sobrevivência destas bactérias durante a fase estacionária (Kazmierczak *et al.*, 2005).

1.4.2 Fatores *sigma* de função extracitoplasmática (ECF)

A resposta bacteriana ao estresse pode ser classificada em citoplasmática ou extracitoplasmática dependendo se o estresse resulta na geração de proteínas desnaturadas no citoplasma ou na membrana/periplasma, respectivamente. Como na

membrana/periplasma, as proteínas apresentam uma mobilidade reduzida, há escassez de ATP e o ambiente é predominantemente oxidante, é necessário um sistema de resposta ao estresse específico para esta região da célula bacteriana, sendo que os fatores *sigma* ECF possuem um importante papel na regulação deste sistema (Bashyam e Hasnai, 2004; Raivio e Silhavy, 2001).

Os fatores *sigma* ECF se destacam dentre os fatores *sigma* alternativos por compreenderem proteínas que freqüentemente controlam processos relacionados ao envelope celular bacteriano, incluindo secreção, síntese de exopolissacarídeos, influxo/efluxo de ferro, e síntese de proteases extracelulares. Tais processos compõem parte do repertório de invasão do hospedeiro e de fuga do sistema imunológico utilizado por bactérias patogênicas durante a infecção (Helmann, 2002; Bashyam e Hasnai, 2004; Jordan *et al.*, 2008).

A transcrição dos genes codificadores de cada fator *sigma* ECF pode ser regulada pelo próprio fator σ que está sendo produzido ou por um ou mais fatores σ distintos. Geralmente os fatores *sigma* são co-transcritos com um fator anti-sigma transmembrânico que possui um domínio sensorial extracitoplasmático e um domínio inibitório intracelular. Os fatores anti-sigma se ligam aos fatores *sigma* cognatos e os inibem, atuando como reguladores negativos. 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* cognato, o qual pode então se ligar à RNA polimerase para estimular a transcrição de genes específicos. 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 (Helmann, 2002; Nesvera e Pátek, 2008).

Análises comparativas entre seqüências genômicas bacterianas disponíveis em bancos de dados revelaram uma ampla variação no número de genes de fatores *sigma* ECF entre diversos microrganismos: 0 em *Mycoplasma*, 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* que possuem o genoma completamente seqüenciado, 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 (Jordan *et al.*, 2008; Stáron *et al.*, 2009).

O número de fatores *sigma* ECF geralmente se correlaciona com a variabilidade de ambientes encontrados por uma dada espécie bacteriana. Assim, apesar do número de fatores *sigma* ECF geralmente aumentar proporcionalmente com o aumento do tamanho do genoma, microrganismos que desenvolveram programas de

diferenciação, como esporulação, tendem a apresentar maiores taxas de fatores *sigma* ECF / tamanho do genoma do que a maioria dos patógenos obrigatórios ou bactérias comensais (Sachdeva *et al.*, 2009).

Na tentativa de avaliar se há um conjunto mínimo de genes de fatores *sigma* ECF necessários para o crescimento vegetativo de *B. subtilis*, Asai e cols (2008) mutaram todos os 7 genes de fatores σ^{ECF} do genoma de uma linhagem desta bactéria, e verificaram que esta era viável na ausência de estresses, sendo ainda capaz de esporular como a bactéria selvagem.

O primeiro fator *sigma* ECF identificado foi o fator σ^{E} de *E. coli*, o qual foi reconhecido como um segundo fator *sigma* de resposta ao estresse térmico nesta bactéria (Kazmierczak *et al.*, 2005). Este fator *sigma* foi descoberto através de um estudo realizado com o gene *degP* de *E. coli*, o qual consiste em um gene essencial para o crescimento em temperaturas elevadas, que codifica uma protease periplasmática. Foi observado que a transcrição deste gene é ativada em temperaturas elevadas (em torno de 50°C), e que esta ativação não depende do fator *sigma* 32 de resposta ao estresse térmico, o qual ativa a expressão de proteínas chaperones e de proteases quando há proteínas desnaturadas no citoplasma. Assim, este estudo revelou que a presença de proteínas desnaturadas no periplasma poderia induzir a expressão do gene *degP* através de um mecanismo dependente de um outro fator *sigma* de resposta ao estresse térmico, o fator *sigma* ECF σ^{E} (Bashyam e Hasnain, 2004; Erickson e Gross, 1989; Raivio e Silhavy, 2001).

Um dos fatores *sigma* ECF de *C. glutamicum* envolvido na adaptação a situações geradoras de estresse é o fator σ^{M} . Análises de microarranjo de DNA envolvendo uma linhagem desta bactéria desprovida do fator σ^{M} revelaram que este fator regula a atividade dos genes codificadores das proteínas tiorredoxina (*trxC* e *trxB1*) e tiorredoxina redutase (*trxB*) e do operon *suf*, os quais estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo resultante da modificação de grupos tiol (-SH). Além disso, o fator σ^{M} ativa a expressão de genes que codificam proteínas chaperones (*groES*, *groEL*, *clpB*) e proteínas envolvidas na resposta ao estresse térmico (*hspR*, *dnaJ*, *grpE*). A linhagem de *C. glutamicum* deficiente para o fator σ^{M} ainda apresentou uma redução na viabilidade celular após a exposição aos estresses térmico e oxidativo (Nakunst *et al.*, 2007).

A análise de diversas seqüências gênicas revelou que os promotores reconhecidos pelos fatores σ^{M} e σ^{H} apresentam seqüências consenso -10 e -35 similares entre si (Nesvera e Pátek, 2008), o que sugere algum envolvimento do fator σ^{H} na resposta ao estresse oxidativo. Através da deleção do gene *sigH* de *C. glutamicum*, Nakunst e cols (2007) demonstraram que a indução dos estresses

térmico e oxidativo provocou um aumento da expressão do gene *sigM* somente na linhagem selvagem, indicando que este gene é provavelmente regulado pelo fator σ^H . Contudo, como os fatores σ^M e σ^H reconhecem promotores estruturalmente similares, é provável que a expressão do gene *sigM* também seja auto-regulada (Nesvera e Pátek, 2008). Kim e cols (2005) verificaram que uma linhagem de *C. glutamicum* deficiente para o fator σ^H se mostrou mais susceptível aos estresses térmico e oxidativo.

Recentemente, uma linhagem de *C. glutamicum* deficiente para o fator σ^E tornou-se mais vulnerável a condições de estresse de superfície, como tratamento com SDS ou lisozima, e ao estresse térmico, além de muito mais sensível a diferentes antibióticos (Park *et al.*, 2008). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa ainda demonstraram que uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* deficiente para o fator σ^E se tornou mais susceptível aos estresses nitrosativo, ácido e de superfície com SDS (Pacheco, 2010).

1.4.3 Fatores *sigma* e virulência

A regulação da expressão gênica tem um papel essencial nas adaptações e modificações necessárias para a sobrevivência da bactéria às alterações ambientais extremas e rápidas, sendo assim crucial para uma infecção bem-sucedida. Os fatores σ alternativos podem regular a expressão tanto de genes de virulência, os quais codificam proteínas cujas funções são essenciais para que a bactéria estabeleça efetivamente uma infecção no organismo hospedeiro, quanto de genes associados à virulência, os quais podem contribuir para a sobrevivência do patógeno no meio ambiente ou para a sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Além disso, os fatores σ alternativos podem regular a expressão de outros fatores σ ou de outros reguladores transcricionais, os quais, por sua vez, regulam a expressão de genes de virulência e de genes associados à virulência. Assim, o estudo dos fatores σ alternativos e dos genes regulados por estes tem se mostrado bastante promissor para a identificação de novos fatores de virulência bacterianos (Bashyam e Hasnain, 2004; Kazmierczak *et al.*, 2005).

Um estudo demonstrou que o fator σ^B está envolvido na resistência a condições de estresse nas bactérias patogênicas *L. monocytogenes* e *Bacillus anthracis*, agentes etiológicos da listeriose e do antrax, respectivamente. Em *L. monocytogenes*, o fator σ^B participa de uma rede regulatória envolvida na indução da expressão dos genes de internalinas, que consistem em proteínas que contribuem para a invasão das células dos mamíferos, e de outros genes envolvidos na virulência desta bactéria (McGann *et al.*, 2007). Em *B. anthracis*, a inativação do fator σ^B gerou

uma linhagem mutante atenuada em relação à linhagem selvagem, indicando uma associação do fator σ^B com a virulência deste microrganismo (Fouet *et al.*, 2000). Na tabela 1 podemos encontrar outros exemplos de fatores *sigma* alternativos envolvidos na ativação de mecanismos relacionados à virulência.

Tabela 1.1 - Fatores *sigma* alternativos envolvidos na virulência de diferentes bactérias patogênicas

Fator <i>sigma</i> (Família/Classe)	Espécie bacteriana
Família σ^{70}	
Resposta a estresses	
σ^B	<i>B. anthracis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. Epidermidis</i>
σ^S	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enterica</i> var. Typhimurium, <i>S. enterica</i> var. Typhi
σ^F	<i>M. tuberculosis</i>
Sub-família ECF	
RpoE	<i>H. influenzae</i> , <i>S. enterica</i> var. Typhimurium, <i>V. Cholerae</i>
AlgU; PvdS e Fpvl	<i>P. aeruginosa</i>
σ^C ; σ^D ; σ^E ; σ^H	<i>M. tuberculosis</i>
HrpL	<i>Erwinia spp.</i> , <i>P. Syringae</i>
σ^{28}	
FliA	<i>C. jejuni</i> , <i>H. pylori</i> , <i>S. enterica</i> var. Typhimurium, <i>V. cholerae</i> , <i>Y. Enterocolitica</i>
Família σ^{54}	
σ^N	<i>C. jejuni</i> , <i>H. pylori</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. syringae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. Parahaemolyticus</i>

Adaptado: Kazmierczak *et al.*, 2005.

O fator homólogo de σ^E da bactéria *P. aeruginosa* (gene *algU/algT*) consiste em um importante fator σ^{ECF} envolvido na virulência deste microrganismo. Isolados patogênicos de *P. aeruginosa* produzem um exopolissacarídeo abundante conhecido como alginato, que é considerado um dos principais fatores de virulência desta bactéria. O fator algU, além de controlar a expressão dos genes de resposta aos

estresses oxidativo e térmico, também regula a expressão das enzimas da via de biossíntese do alginato (Potvin *et al.*, 2008; Wood e Ohman, 2009). Similarmente, os fatores σ^E de *S. enterica* var. Typhimurium e de *M. tuberculosis* também regulam a expressão de genes que proporcionam resistência ao estresse oxidativo, auxiliando na sobrevivência da bactéria dentro de macrófagos (Testerman *et al.*, 2002; Manganelli *et al.*, 2001; Kazmierczak *et al.*, 2005).

Em um estudo envolvendo os fatores *sigma* ECF, Manganelli e cols (1999) desenvolveram um sistema de PCR em tempo real que utiliza várias sondas fluorescentes para avaliar simultaneamente a expressão diferencial dos 10 fatores *sigma* ECF presentes no genoma da bactéria *M. tuberculosis*, sob diversas condições ambientais. Os fatores σ^E e σ^H tiveram níveis de transcrição aumentados após o choque térmico e o fator σ^E ainda respondeu ao estresse de superfície celular induzido por tratamento com SDS.

Estudos posteriores demonstraram que uma linhagem de *M. tuberculosis* deficiente para o fator σ^E era mais susceptível aos estresses térmico, oxidativo e de superfície induzido por SDS (Manganelli *et al.*, 2001). Além disso, esta linhagem se mostrou mais sensível à atividade microbicida de macrófagos em cultura e altamente atenuada em camundongos infectados experimentalmente, indicando a importância deste fator *sigma* para a virulência da bactéria (Manganelli *et al.*, 2004). Análises de microarranjo desta linhagem, quando exposta ao estresse de superfície, revelaram que o fator σ^E regula a expressão de enzimas envolvidas na degradação de ácidos graxos, de algumas proteínas do choque térmico, de genes envolvidos na biossíntese do ácido micólico e de genes que participam da resposta ao estresse oxidativo, além de regular a expressão do fator σ^B (Manganelli *et al.*, 2001).

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 (Mandanelli *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, o fator σ^H regula sua própria expressão e a expressão dos fatores σ^B e σ^E (Mandanelli *et al.*, 2002).

O fator σ^K de função extracitoplasmática é conhecido por seus *regulons* relativamente pequenos e pelo seu importante papel na regulação da transcrição de genes codificadores de proteínas imunogênicas, como MPB83 e MPB70, de linhagens do Bacilo Calmette-Guérin (BCG) de *M. bovis*, as quais consistem em linhagens atenuadas da bactéria que são utilizadas na vacinação contra a tuberculose. A expressão das proteínas MPB83 e MPB70 varia consideravelmente entre as linhagens do BCG, o que contribui para a grande diversidade observada na resposta a esta vacina. Foi verificado que uma mutação no códon iniciador do gene *sigK* está relacionada à fraca expressão deste gene e, conseqüentemente, a uma menor produção das proteínas MPB83 e MPB70 em algumas linhagens do BCG (Charlet *et al.*, 2005). 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*.

1.4.4 Fatores *sigma* alternativos de *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. Estes fatores foram identificados através da análise do genoma de *C. pseudotuberculosis*, utilizando as ferramentas bioinformáticas disponíveis no banco MiST2 (*Microbial Signal Transduction database*) (Pacheco, 2010).

1.4.5 Fator *sigma* C

Dentre os fatores *sigma* alternativos de *C. pseudotuberculosis*, destaca-se o fator *sigma* C, o qual tem sido associado à virulência em *M. tuberculosis*, uma bactéria filogeneticamente próxima de *C. pseudotuberculosis*. O fator σ^C é conservado em todas as espécies patogênicas do gênero *Mycobacterium*, consistindo inclusive em um dos dois únicos fatores *sigma* ECF encontrados em *Mycobacterium leprae*, e está ausente em todas as espécies não patogênicas deste gênero seqüenciadas até o momento (Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2009).

Em *M. tuberculosis*, o gene que codifica o fator σ^C é expresso durante a fase exponencial, e os seus níveis de mRNA diminuem significativamente durante a fase estacionária e após a exposição da bactéria aos estresse térmico e de superfície com SDS. Além disso, o transcrito do fator σ^C é o mais abundante dentre os transcritos de

todos os fatores *sigma* de *M. tuberculosis* durante a fase exponencial, apesar da maior parte do cerne da RNA polimerase se encontrar associada com os fatores σ^A e σ^B durante esta fase do crescimento bacteriano. Assim, acredita-se que o fator σ^C deve ser traduzido com uma baixa eficiência ou que ele deve apresentar uma baixa afinidade pelo cerne da RNA polimerase nesta bactéria (Manganelli *et al.*, 1999).

Sun e cols (2004) construíram uma linhagem de *M. tuberculosis* mutante para o fator σ^C e verificaram que este não é essencial para a sobrevivência da bactéria no interior de macrófagos alveolares ativados ou de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos. Entretanto, esta linhagem deficiente para o fator σ^C se mostrou significativamente atenuada em relação à linhagem selvagem em modelo murino, indicando que este fator *sigma* desempenha um papel importante para a virulência da bactéria. Através de um estudo de microarranjo genômico, estes autores também demonstraram que o fator σ^C modula a expressão de vários genes associados à virulência, incluindo os genes *hspX*, *senX3*, *mtrA* e *fbpC*, os quais codificam um homólogo de α -cristalina, um sensor histidina kinase de dois componentes, um regulador transcricional de dois componentes e o antígeno 85C, respectivamente. Além disso, eles observaram que o fator σ^C regula a expressão de seu próprio gene e do gene que codifica o fator σ^B . Assim, acredita-se que a atenuação da linhagem mutante para o fator σ^C pode ser decorrente de uma alteração na regulação da expressão destes e de outros genes associados à virulência, ou de uma deficiência do sistema de regulação da transcrição necessário para a virulência da bactéria. Estes autores também demonstraram que a linhagem de *M. tuberculosis* deficiente para o fator σ^C se prolifera e persiste no tecido pulmonar dos camundongos em níveis semelhantes à linhagem selvagem; contudo, gerando uma resposta inflamatória menos acentuada e não causando a morte dos animais. Deste modo, esta linhagem é capaz de persistir no hospedeiro e estimular a resposta imunológica sem causar alterações patológicas nos tecidos deste, consistindo assim em um bom candidato vacinal contra a tuberculose.

Abdul-Majid e cols (2008) observaram que camundongos infectados com a linhagem de *M. tuberculosis* mutante para o fator σ^C apresentaram níveis menores de citocinas inflamatórias e de infiltrado neutrofilico quando comparado com camundongos infectados com a linhagem selvagem, sugerindo que a capacidade da linhagem deficiente para o fator σ^C de se proliferar e persistir nos pulmões dos camundongos sem causar danos severos pode ser decorrente da inabilidade do hospedeiro de desencadear uma resposta imunológica precoce eficaz contra a bactéria. Assim, alterações nas propriedades antigênicas desta linhagem podem ser responsáveis pela atenuação da doença no hospedeiro. Através de estudos com

cobaias, Karls e cols (2006) verificaram que a linhagem de *M. tuberculosis* mutante para o fator σ^C não acarretou a formação de granulomas necróticos nos pulmões e no baço destes animais, sugerindo que os genes regulados pelo fator σ^C desempenham um papel importante na patogênese e na sobrevivência da bactéria.

Através de mutagênese com o emprego de transposons, Yukawa e cols (2007) obtiveram linhagens de *C. glutamicum* mutantes para os fatores *sigma* B, E, H e M, mas eles não conseguiram obter linhagens mutantes para os fatores *sigma* A e C, o que indica que o fator *sigma* C deve ser essencial para a viabilidade desta bactéria.

O gene que codifica o fator *sigma* C (*sigC*) está presente em todas as linhagens de *C. pseudotuberculosis* seqüenciadas até o momento (linhagens 1002, C231, FRC41 e I19), sendo que a seqüência de nucleotídeos da matriz aberta de leitura (do inglês, ORF) deste gene é idêntica entre estas linhagens e ele não está organizado em operon. Na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*, este gene está localizado na fita complementar da região genômica compreendida entre 183.855 pb e 184.418 pb (figura 1.3).



Figura 1.3 – Localização do gene *sigC* (Cp1002_172) no genoma da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*.

Através de análises *in silico* realizadas por nosso grupo de pesquisa utilizando a ferramenta de bioinformática *SoftBerry* - BPRM (*Prediction of Bacterial Promoters*), foi possível a identificação de quatro possíveis regiões promotoras do gene que codifica o fator *sigma* C de *C. pseudotuberculosis* numa região de 1500 pb à montante do início da ORF deste gene, a qual possui 564 pb (figura 1.4).

```

TGGATAAAGTCATCATCCTCAGCATGCTTTACATAGGCTGCACGGGTGAGATCGGTACCG
TGAGGATCGGGGTTAACAAAAAGATCACTTGCCTGACCATAGGTAATTCCCGAAGAGGAA
GTCTCACCGTCATCAAGATAACCCGCACCCCTTGCTATAGCGGTTTGGTGAGTACACCGGA
GCATCCGCCGGGTTGAACTGATAGGCCATTGCCCTTCATGCTCATAGGTGTTCACTGGA
ACCACCGGCTGGTTGATTGGCAGCTGACGATAGTTTGCACCAATGCGCGTGCCTGAGCA
TCTGCGTAAGCAAACGCGGAGCCATCAGCATACGGTCAGGCGACAGGCCTACACCTGGC
ACCAAGTTGGATGGGTGAGCGCCAGCTGCTCAATCTGAGTGAAAAAGTTCTTTGGGTTG
CGTTAAGAACAAGTAACCGACATCAACCAGCGGATAGTCCTTCTGCGACCACGTCTTG
GTCAGGTCAAAGGGGTTCCAACGGTAGTTTTCCGCATCCTCAAAAAGGCATAATCTGAACC
TTGACATCCCAGATCGGGAAGTCGCCGTGAGCGATAGCGTTGTAGAGGTCCTCGCGATGA
TGGTCGGCATTTCTTACCAGCCATCTCTTGAGCCTCAGCATCAGTAAAGGTATCCCAGCCC
TGACGGGACTTAAAGTGATACTTAAACCATACCGGCTTACCCTCCTCATTGATCCACTGG
AAGGTGTGAGAACCAAAGCCATCCTGGTGGCGAGAAGTCTTAGGGGTACCGCGATCACCC
ATGAGGTAGGTACCTGGTGCAGACTCAGGAGTACGGGTCCAGAAGTCCCAGTGCATA
TCCGCATCCCGGAGCCCATTACGGCCTAGACGCTTCTGAGAGTGATGAAATCCGGGAAC
TTAATGGCGTGCAGCAGGAAGAAGGTGGGGGTTTTGTGCCCACGATGTCATAGTTACCA
TCCTGGGTCCAGAAACGTAGAGCGAATCCGTGCACGTCACGCCAAGTATCCGGGGAGCCC
TGCTCGCCAGCCACCGTGGAGAATCGGATAGCCATCGGGGTGACAGTGCCCTTTTGGAAAG
AGCTTAGCCTTGGTGTATGCCGATACATCCTCAGTGATGTGCAGCTCACCAAAGGCGCCG
TGGCCTTTAGCGTGGGGATTGCGCTCTGGGACGCGCTCGCGGTTGAAGTGAGCGAGCTTC
TCAATCAGGTGGAGGTCAATTGAGAACATTAGCCCCCTGAGGTCCCGCAGTGATGGAGATG
TTCTCGCTAGGAACCGGCTGGCCACCTTCGCGTGTGTGTAAAGCAACAGGTTTCACTGCGC
TCTCCGGCGCCGAGAATGGGATCGACTGGTGGTTCATGAAAAATCCCTCCTTTAAGGG
CTGGCTTTGGAGTGGGTCTTAACTAAAAATAACCTTACATTTGAAAACTAAAACTTGCA
ACAGATTTTTATTGAGAGGTTACCTTACAACCTTAGTTTAGGTGGTAAAGTCTTAGTT
ATGAAGAACTCGGAACGCGATGATCGCGTCACCCAACGGCACTCGCTGCCGGCCGCGGC
GACAAAACCGCGCTCACCGAGTTCATCCGAGAGACCCAAAATGACGTCTGGCGCTGCTC
GCCACCTAGGGGGCAGCGAAATCGCCGACGATCTCACCCAAGAGACCTACCTCCGCGTC
ATGGGCGCCCTACCCCGCTTTGCGGCACGCTCATCGGCAAGAACATGGTTACTCTCACTC
GCACGCCGCGTATGGGTAGACAATATCCGTTCATGACATGGCCCGCCCCCGCAAATCCTCC
GCAGAAGTAGAGGACCTTGACCCCGCGGTGCTCTCCACCAATGGCGAAACACCTGGTCC
GACTGGATTGACGTCCGTTTGCTTATCGACGCCCTCCCTACCGAGCGTCGTGAAGCCCTC
ATTCTGACGCAAGTGTCTCGGTTACTCCTACGAGGAAGCAGCAAAAATCGCCAAACGTCCGC
ATCGGCACCATTCGCTCCCGCGTAGCTCGCGCGCGTGCCGACGTGATCGCAGCAGCCGGG
CGCCCCAATGCAGCTAGCGCTTAA

```

Figura 1.4 – Possíveis regiões promotoras do gene *sigC* de *C. pseudotuberculosis* numa região de 1500 pb à montante do início da ORF deste gene. As possíveis regiões promotoras foram identificadas utilizando a ferramenta *SoftBerry* – BPROM e estão destacadas em azul. Os códons de início e de término da tradução da ORF deste gene estão destacados em vermelho.

1.4.5.1 Fator *sigma C* e ilhas de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*

A busca por ilhas de patogenicidade em genomas bacterianos é realizada através da procura por várias características ligadas à transferência horizontal de genes, tais como diferenças no *codon usage*, conteúdo de G + C ou desvio na frequência de dinucleotídeos; e seqüências de inserção ou regiões flanqueadoras de tRNA juntamente com genes codificadores de transposase, os quais são importantes

para a incorporação de DNA por transformação, conjugação ou transdução (Dobrindt *et al.*, 2004). O estudo das ilhas de patogenicidade pode auxiliar na identificação de fatores de virulência bacterianos, já que elas apresentam altas concentrações de genes de virulência, os quais medeiam mecanismos de adesão, invasão, colonização, proliferação no hospedeiro e evasão do sistema imunológico (Karaolis *et al.*, 1998. Schumann, 2007).

Através de análises *in silico* realizadas por nosso grupo de pesquisa, foram encontradas sete regiões no genoma da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* que apresentam a maioria ou todas as características de regiões adquiridas horizontalmente. Além disso, estas regiões estão ausentes no genoma de espécies não patogênicas pertencentes ao mesmo gênero, como *C. glutamicum*, e assim, elas foram classificadas potencialmente como ilhas de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis* (PICp). Através de análises dos genes presentes nestas 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.

Assim, é provável que o fator σ^C regule a expressão de genes que são importantes para a resposta de *C. pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse ambiental, contribuindo para a sobrevivência e para a virulência desta bactéria.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do fator *sigma C* de *C. pseudotuberculosis* na resposta a diferentes condições de estresse ambiental.

2.2 Objetivos específicos

- Construir uma linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* com interrupção no gene que codifica o fator *sigma C*;
- Confirmar a obtenção da linhagem mutante para o fator *sigma C* através de ensaios de PCR;
- Expor as linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* a diferentes condições de estresse ambiental *in vitro*;
- Comparar a resistência das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* a estas condições de estresse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

Foi utilizada a linhagem 1002 selvagem de *C. pseudotuberculosis*. Esta linhagem foi cultivada em caldo infusão cérebro-coração (BHI) ou BHI 1,5% ágar, a 37°C por 48 horas. Quando necessário, o antibiótico canamicina foi acrescentado ao meio de cultura a 25 µg/mL.

A linhagem Top 10 de *E. coli* foi utilizada para todos os procedimentos de clonagem. Esta linhagem foi cultivada em caldo Luria-Bertani (LB) ou LB 1,5% ágar, a 37°C sob agitação por 18 horas. Quando necessário, os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) ou canamicina (50 µg/mL) foram acrescentados ao meio de cultura.

3.2 Construção de uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*

O DNA genômico da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* foi extraído de acordo com um protocolo previamente padronizado no nosso laboratório (Pacheco *et al.*, 2007). Um fragmento interno do gene que codifica o fator *sigma C* de *C. pseudotuberculosis* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA genômico da linhagem 1002. As tabelas 3.1 e 3.2 apresentam os iniciadores e as condições utilizadas na reação de PCR, respectivamente.

Tabela 3.1 – Iniciadores utilizados para a amplificação do fragmento interno do gene que codifica o fator *sigma C* de *C. pseudotuberculosis*

Iniciador	Seqüência
sigC_F	5'-ACCGAGTTCATCCGAGAGAC-3'
sigC_R	5'-GACGTTGGCGATTTTTGCT-3'

Tabela 3.2 – Condições utilizadas para a amplificação do fragmento interno do gene que codifica o fator *sigma C* de *C. pseudotuberculosis*

Etapa	Condição
Desnaturação inicial	3 min a 95°C
Desnaturação	1 min a 95°C
Anelamento	1 min a 59°C
Extensão	1 min a 72°C
Número de ciclos	30 ciclos
Extensão final	7 min a 72°C

O fragmento do gene que codifica o fator *sigma* C amplificado por PCR foi ligado no plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]), de acordo com as recomendações do fabricante, e transformado na linhagem Top 10 de *E. coli*, como previamente descrito (Sambrook *et al.*, 2001). A seleção dos clones transformantes foi realizada em meio LB contendo o antibiótico canamicina a 50 µg/mL. Posteriormente, este plasmídeo foi extraído de alguns clones selecionados de *E. coli* através de miniprep, como previamente descrito (Sambrook *et al.*, 2001), e a presença do inserto nestes foi verificada através de PCR, utilizando os iniciadores e as condições apresentadas nas tabelas 3.1 e 3.2; e de digestão com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen[®]). Um clone de *E. coli* apresentando o fragmento do gene que codifica o fator *sigma* C clonado no pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) foi selecionado, e grandes quantidades do plasmídeo foi extraída deste clone utilizando o kit Wizard[®] Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega[®]), de acordo com as recomendações do fabricante. A seqüência do fragmento do gene que codifica o fator *sigma* C presente no vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) foi confirmada por seqüenciamento.

O plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) contendo o fragmento do gene que codifica o fator *sigma* C foi diretamente transformado na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* para gerar uma linhagem mutante através de um evento de recombinação homóloga simples, como previamente descrito (figura 3.1) (Miyoshi *et al.*, 2002). A seleção dos clones mutantes para o fator *sigma* C foi realizada em meio BHI contendo o antibiótico canamicina a 25 µg/mL.

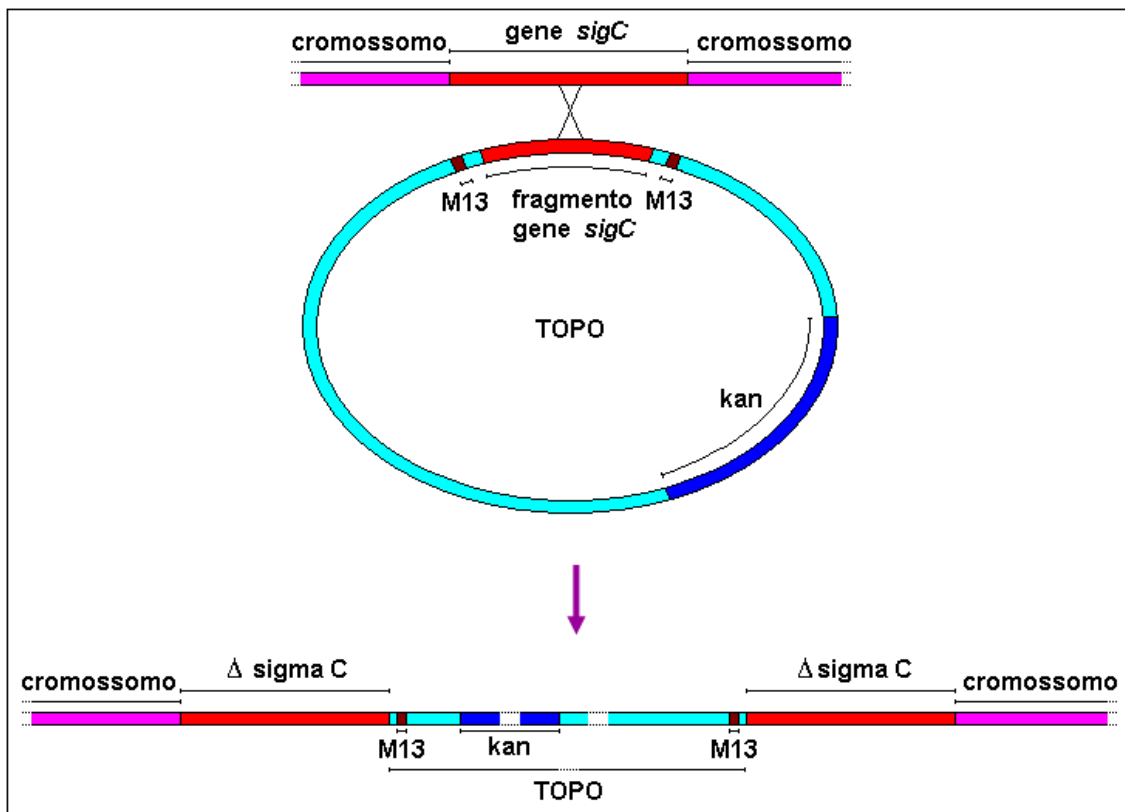


Figura 3.1 – Representação esquemática do evento de recombinação homóloga simples entre o plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) contendo o fragmento do gene que codifica o fator *sigma* C e o gene que codifica este fator *sigma* presente no cromossomo bacteriano para gerar uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* C.

3.3 Caracterização morfológica, bioquímica e molecular da linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* C

A caracterização morfológica da linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* C foi realizada através da coloração de Gram. A caracterização bioquímica foi realizada através dos testes bioquímicos para fermentação dos açúcares glicose, manitol, manose, maltose, ribose e sacarose; para degradação da uréia; para redução de ácido sulfídrico; para redução de nitrato a nitrito; e para produção da enzima catalase. A caracterização molecular foi realizada através de um ensaio de PCR multiplex, no qual são amplificados os genes *16S rDNA*, *rpoB* e *pld* de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.*, 2007).

3.4 Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*

A confirmação do evento recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C* foi realizada através de ensaios de PCR. Para isto, os DNAs genômicos das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* foram extraídos de acordo com um protocolo previamente padronizado no nosso laboratório (Pacheco *et al.*, 2007). A tabela 3.3 apresenta os iniciadores utilizados nas reações de PCR.

As combinações dos diferentes iniciadores são mostradas na figura 3.2 e na tabela 3.4. O tamanho esperado dos fragmentos nas reações de PCR é mostrado na tabela 3.4.

Tabela 3.3 - Iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*

Iniciador	Seqüência
sigC_F	5'-ATGAAGAACTCGGAACGCG-3'
sigC_R	5'-TTAGGCGCTAGCTGCATTG-3'
sigCe_F	5'-ATGAAGAACTCGGAACGCG-3'
sigCe_R	5'-TTAGGCGCTAGCTGCATTG-3'
Kan_F	5'-ATGATTGAACAAGATGGATTG-3'
Kan_R	5'-TTAATAATTCAGAAGAACTC-3'
pTOPO®2.1 M13_F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
pTOPO®2.1 M13_R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tabela 3.4 - Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C* e tamanho esperado dos fragmentos nas reações de PCR

Combinação de iniciadores	Tamanho esperado do fragmento na reação de PCR
Kan_F – Kan_R	794 pb
Kan_F – sigC_F	3277 pb
pTOPO®2.1 M13_F – sigC_R	513 pb
pTOPO®2.1 M13_R – sigC_F	491 pb
sigCe_F – sigCe_R	4866 pb

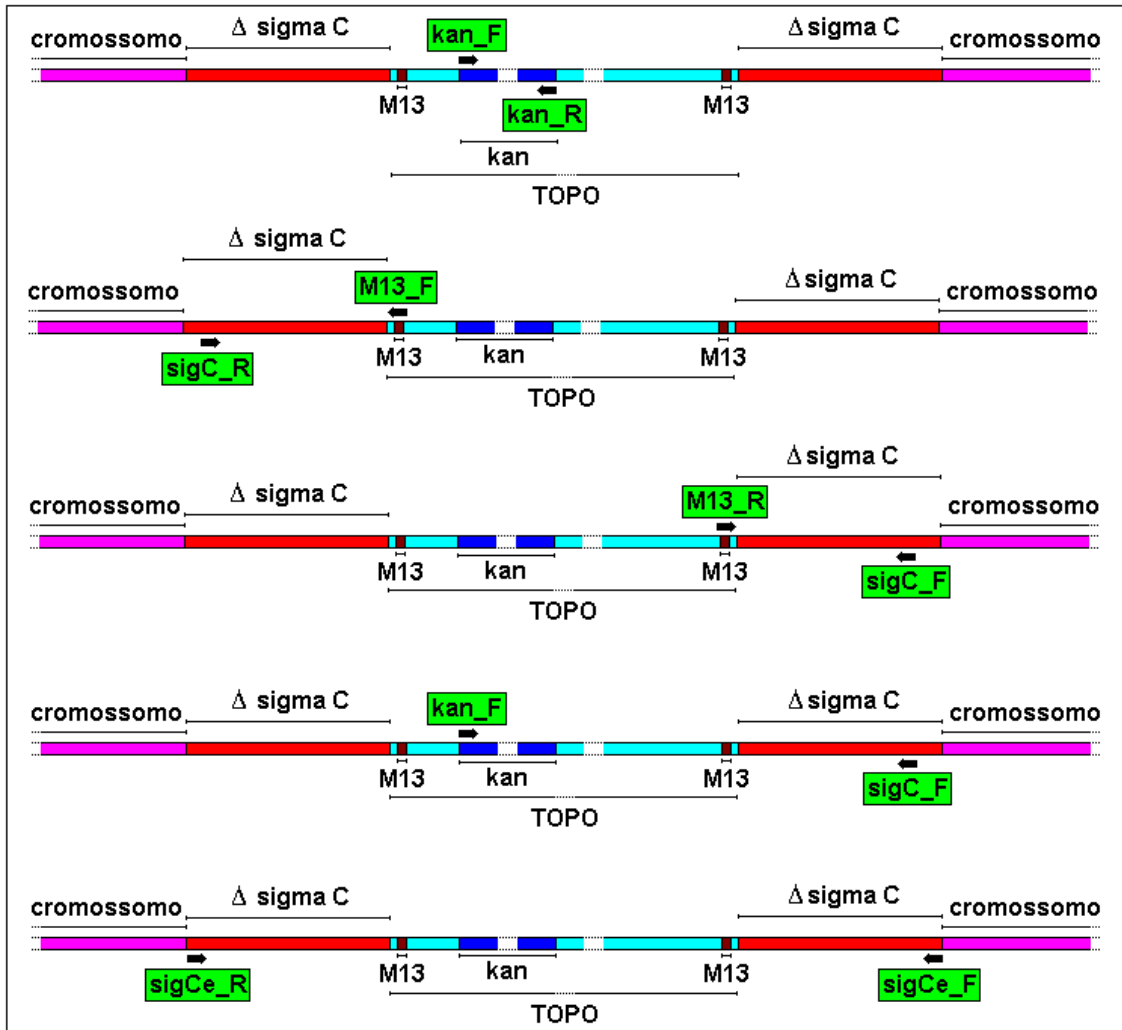


Figura 3.2 – Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator σC .

3.5 Condições de estresse *in vitro*

As diferentes condições de estresse *in vitro* utilizadas para avaliar a resistência da linhagem 1002 selvagem de *C. pseudotuberculosis*, cultivada em meio BHI, e da linhagem mutante para o fator σC , cultivada em meio BHI acrescido de canamicina a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estão descritas na tabela 3.5. As concentrações utilizadas de cada agente gerador de estresse estão em negrito. Estas concentrações foram otimizadas por Pacheco (2010) de acordo com a resistência da linhagem 1002 selvagem de *C. pseudotuberculosis*, submetida às diferentes condições de estresse no início da fase exponencial (*log*) do crescimento.

Tabela 3.5 – Condições de estresse *in vitro* e resistência da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* às diferentes condições de estresse

Condição de estresse	Método	Agente gerador de estresse	Concentrações testadas	Resistência (1002 wt) no início da fase log
Estresse osmótico	Ressuspensão da cultura em meio contendo NaCl.	NaCl	0,5 M	> 90%
			1,0 M	50 – 90%
			2,0 M	< 50%
			2,5 M	0%
Estresse oxidativo	Adição de solução comercial de H ₂ O ₂ (30 % em H ₂ O – Sigma-Aldrich®) ao meio de cultura.	H ₂ O ₂	500 µM	100%
			1 mM	> 90%
			2,5 mM	> 90%
			5 mM	> 90%
			10 mM	50 – 90%
			25 mM	< 50%
			40 mM	< 50%
			50 mM	< 50%
			70 mM	< 50%
			100 mM	< 50%
150 mM	< 50%			
200 mM	0%			
Estresse ácido	Ressuspensão da cultura em meio acidificado com solução concentrada de HCl.	HCl	pH 4,0	0%
			pH 4,5	< 50%
			pH 5,0	< 50%
			pH 5,5	50 – 90%
			pH 6,5	50 – 90%
Estresse térmico	Incubação das culturas a diferentes temperaturas.	Temperatura	55°C	0%
			50°C	50 – 90%
			4°C	50 – 90%

Adaptado: Pacheco, 2010

3.6 Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C*

Foram preparados pré-inóculos da linhagem 1002 selvagem e da linhagem mutante para o fator *sigma C* de *C. pseudotuberculosis* em 20 mL de meio BHI acrescido de Tween® 80%. Após 24 horas de crescimento a 37°C, parte dos cultivos foram re-inoculados (1:100) em 80 mL de meio BHI acrescido de Tween® 80%, e incubados a 37°C. Foi acrescentada canamicina a 25 µg/mL ao meio BHI para o cultivo da linhagem mutante. Durante 15 horas, as culturas foram monitoradas, a cada hora, através de leituras de densidade ótica (DO_{600nm}) em triplicata. Os dados de DO_{600nm} foram processados e representados com auxílio do *software* GraphPad Prism v.5.0.

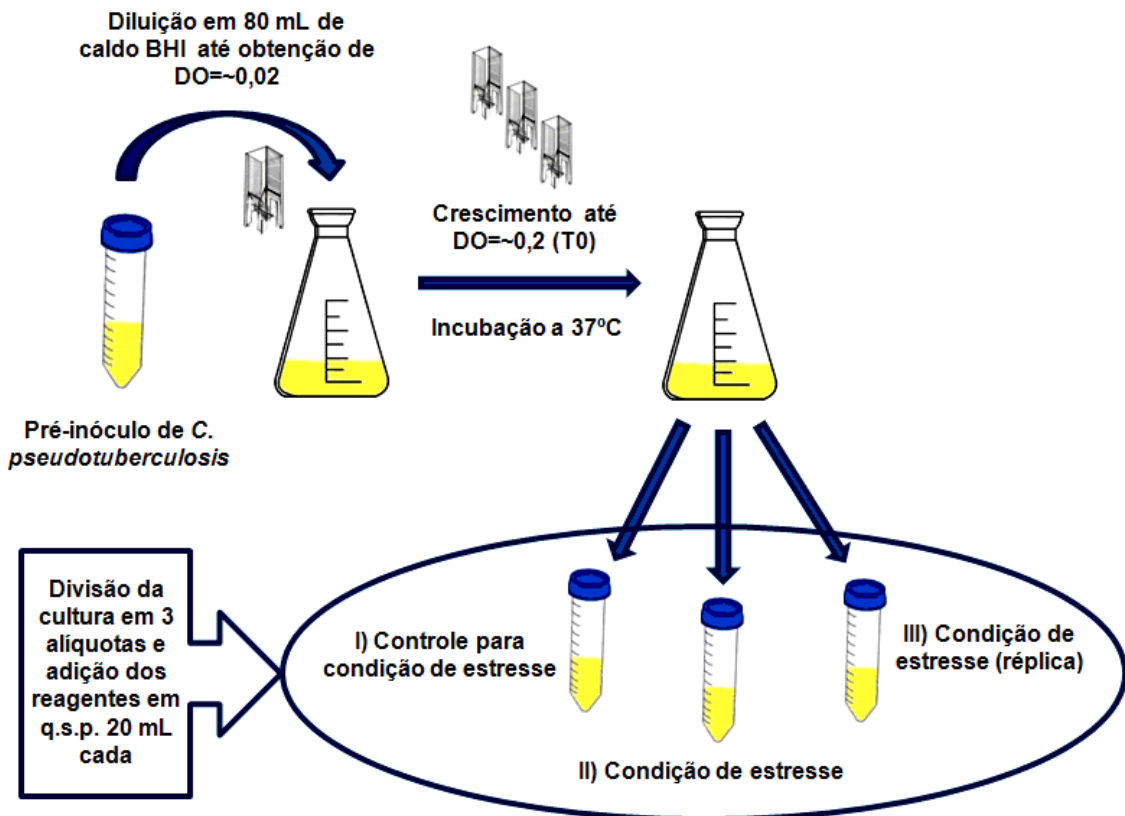
3.7 Resistência das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* às condições de estresse *in vitro*

Foram preparados pré-inóculos da linhagem 1002 selvagem e da linhagem mutante para o fator *sigma C* de *C. pseudotuberculosis* em 20 mL de meio BHI acrescido de Tween[®] 80%. Após 24 horas de crescimento a 37°C, parte dos cultivos foram re-inoculados (1:100) em 80 mL de meio BHI acrescido de Tween[®] 80%, e incubados a 37°C até atingirem o início da fase exponencial do crescimento ($DO_{600nm} \approx 0,2$). Foi acrescentada canamicina a 25 µg/mL ao meio BHI para o cultivo da linhagem mutante.

Quando foi atingida a $DO_{600nm} \approx 0,2$, as culturas foram divididas em três alíquotas e o agente gerador de estresse (tabela 3.5) foi aplicado a duas alíquotas de cada cultura em qsp 20 mL, consistindo a terceira alíquota em um controle (figura 3.3). O monitoramento das curvas de crescimento seguiu por meio de leituras de DO_{600nm} em triplicata e plaqueamento de diluições seriadas em duplicata para os tempos 15, 60, 180 e 270 minutos após a adição do agente gerador de estresse às culturas (figura 3.4).

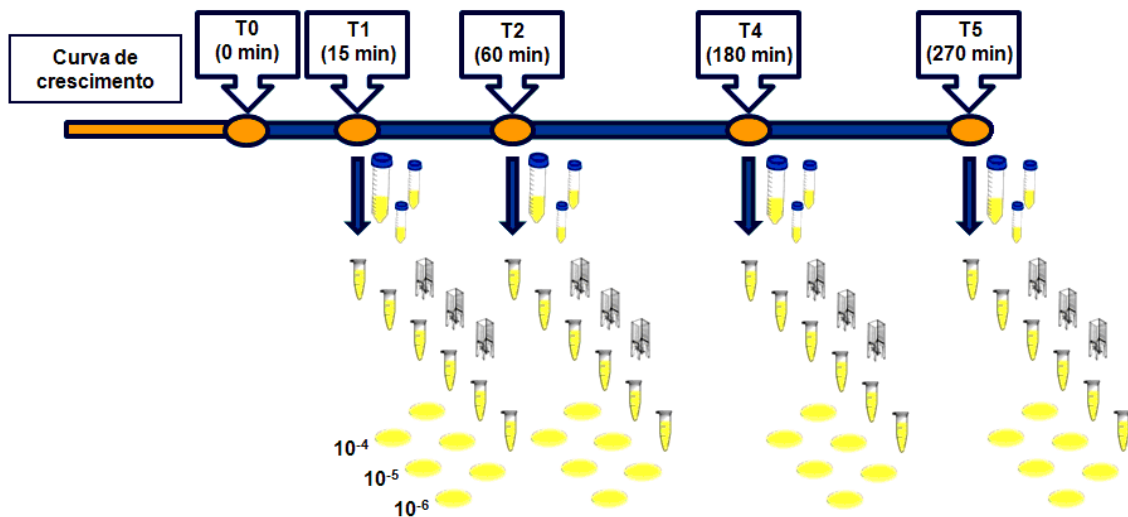
A partir dos dados de DO_{600nm} , foi calculado o crescimento relativo das bactérias expostas às condições de estresse em relação às bactérias crescidas sob condições normais, e a partir dos dados de logUFC/mL, foi calculada a viabilidade relativa das bactérias expostas às condições de estresse em relação às bactérias crescidas sob condições normais. Os dados de DO_{600nm} , de logUFC/mL, de crescimento relativo e de viabilidade relativa foram processados e representados graficamente com auxílio do *software* GraphPad Prism v.5.0.

As diferenças no crescimento relativo e na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* a cada agente gerador de estresse foram validadas estatisticamente utilizando-se o Teste T de Student.



Adaptado: Castro, 2009

Figura 3.3 – Representação esquemática da etapa inicial da curva de crescimento para avaliação da suscetibilidade de *C. pseudotuberculosis* a agentes geradores de estresse. Após a diluição do pré-inóculo (1:100), a DO_{600nm} da cultura foi regularmente monitorada em espectrofotômetro até atingir $\sim 0,2$. Este momento foi considerado o tempo inicial (T_0) da curva, quando houve a divisão da cultura em três alíquotas e o agente gerador de estresse foi aplicado a duas alíquotas, consistindo a terceira alíquota em um controle.



Adaptado: Castro, 2009

Figura 3.4 – Representação esquemática dos procedimentos adotados para o monitoramento das curvas de crescimento em intervalos de tempo específicos. Para todos os tempos definidos (15, 60, 180 e 270 minutos) foram realizadas leituras de DO_{600nm} em triplicata e diluições seriadas em múltiplos de 10, sendo as três maiores diluições destas (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) plaqueadas em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção de uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*

Um fragmento interno do gene que codifica o fator *sigma C* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis*.

O fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* amplificado por PCR foi ligado no plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]), e clonado na linhagem Top 10 de *E. coli*. Este plasmídeo foi extraído de alguns clones selecionados de *E. coli* transformada através de miniprep, e a presença do inserto neste foi verificada através de PCR e de digestão com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen[®]).

Um clone de *E. coli* apresentando o fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* clonado no pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) foi selecionado, e grandes quantidades do plasmídeo foi extraída deste clone através de maxiprep. Na figura 4.1 podemos visualizar o plasmídeo extraído através de maxiprep e a confirmação da presença do inserto neste através de digestão com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen[®]), e na figura 4.2 podemos visualizar a confirmação da presença do inserto neste através de PCR.

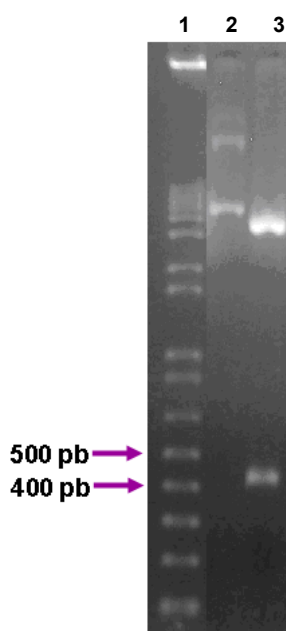


Figura 4.1 – Confirmação da presença do fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* no pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) através de digestão com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen[®]). Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]) (canaleta 1), plasmídeo contendo o fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* não digerido (canaleta 2), plasmídeo contendo o fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* digerido (canaleta 3). O fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* possui 402 pb.

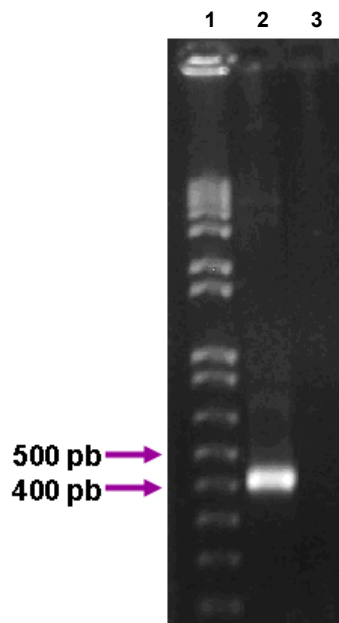


Figura 4.2 – Confirmação da presença do fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* no pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) através de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]) (canaleta 1), fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* amplificado por PCR (canaleta 2), controle negativo (canaleta 3). O fragmento do gene que codifica o fator *sigma C* possui 402 pb.

4.2 Caracterização morfológica, bioquímica e molecular da linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*

Através da coloração de Gram, foi observado que tanto a linhagem 1002 selvagem quanto a linhagem mutante para o fator *sigma C* são Gram-positivas e apresentam formato coco-bacilar.

Através dos testes bioquímicos, foi observado que tanto a linhagem 1002 selvagem quanto a linhagem mutante para o fator *sigma C* fermentam glicose, manose, maltose, e sacarose; não fermentam manitol e ribose; degradam a uréia; não reduzem o ácido sulfídrico; não reduzem o nitrato a nitrito; e produzem a enzima catalase.

Através do ensaio de PCR multiplex, foram amplificados a partir do DNA genômico da linhagem 1002 selvagem e da linhagem mutante para o fator *sigma C* os fragmentos de 816 pb, 446 pb e 203 pb, correspondentes aos genes *16S rDNA*, *rpoB* e *pld* de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente, confirmando que estas consistem em linhagens de *C. pseudotuberculosis*.

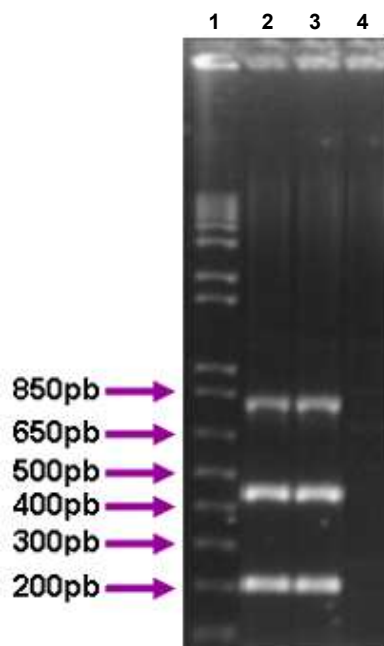


Figura 4.3 – Ensaio de PCR multiplex para caracterização molecular da linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) (canaleta 1), DNA genômico da linhagem mutante para o fator *sigma C* (canaleta 2), DNA genômico da linhagem 1002 selvagem (canaleta 3), controle negativo (canaleta 4). Neste ensaio são amplificados os genes *16S rDNA*, *rpoB* e *pld* de *C. pseudotuberculosis*, os quais possuem 816 pb, 446 pb e 203 pb respectivamente.

4.3 Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*

Os DNAs genômicos das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* foram extraídos, e a ocorrência do evento de recombinação na linhagem mutante foi confirmada através de ensaios de PCR, utilizando-se diferentes combinações de iniciadores (figura 3.2).

A figura 4.4 mostra os fragmentos obtidos nos ensaios de PCR em que foram utilizadas as combinações dos iniciadores Kan_F – Kan_R, Kan_F – sigC_F, pTOPO®2.1 M13_F – sigC_R e pTOPO®2.1 M13_R – sigC_F para a linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*. A figura 4.5 mostra os fragmentos obtidos no ensaio de PCR em que foi utilizada a combinação dos iniciadores sigCe_F – sigCe_R para esta mesma linhagem mutante. Esta combinação de iniciadores possibilita a amplificação do gene inteiro do fator *sigma C* na linhagem selvagem e deste gene interrompido pela inserção do plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) na linhagem mutante. Os tamanhos dos fragmentos obtidos corresponderam ao esperado

(tabela 3.5), de modo que foi confirmada a obtenção de uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C*.

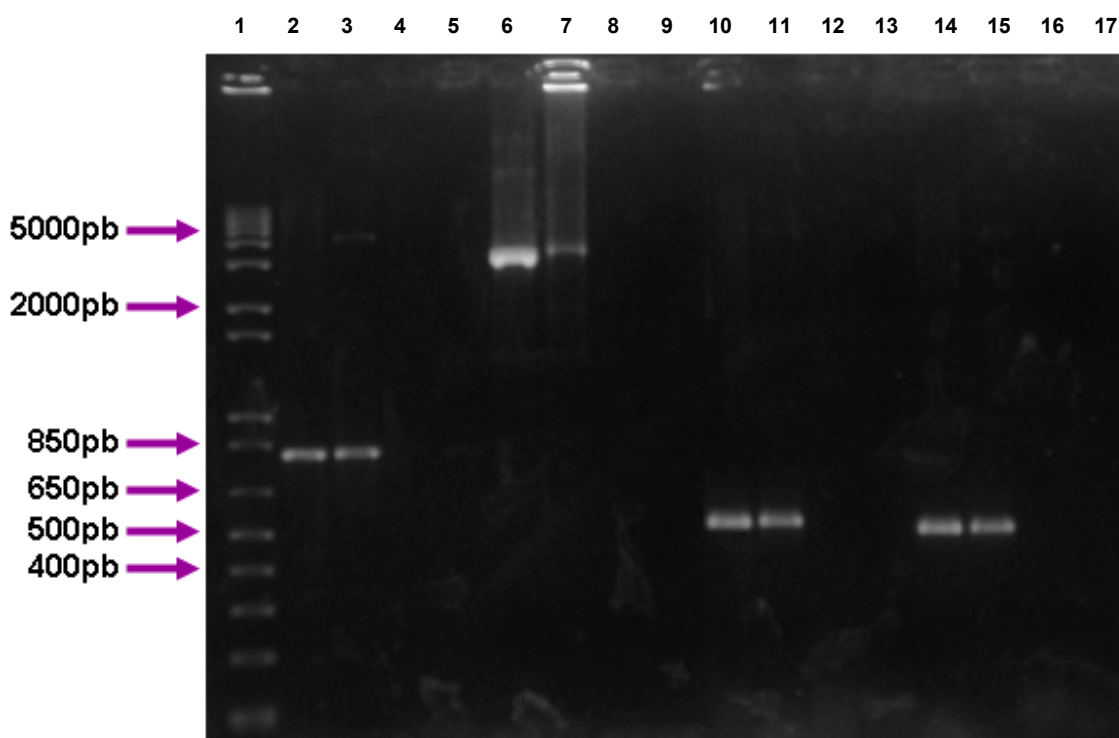


Figura 4.4 – Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C* através de ensaios de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) (canaleta 1); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – Kan_R, o que gera um fragmento de 794 pb (canaleta 2 – linhagem mutante para o fator *sigma C*, canaleta 3 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma C*, canaleta 4 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 5 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – sigC_F, o que gera um fragmento de 3277 pb (canaleta 6 - linhagem mutante para o fator *sigma C*, canaleta 7 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma C*, canaleta 8 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 9 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores pTOPO®2.1 M13_F – sigC_R, o que gera um fragmento de 513 pb (canaleta 10 - linhagem mutante para o fator *sigma C*, canaleta 11 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma C*, canaleta 12 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 13 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação de iniciadores pTOPO®2.1 M13_R – sigC_F, o que gera um fragmento de 491 pb (canaleta 14 - linhagem mutante para o fator *sigma C*, canaleta 15 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma C*, canaleta 16 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 17 – controle negativo).

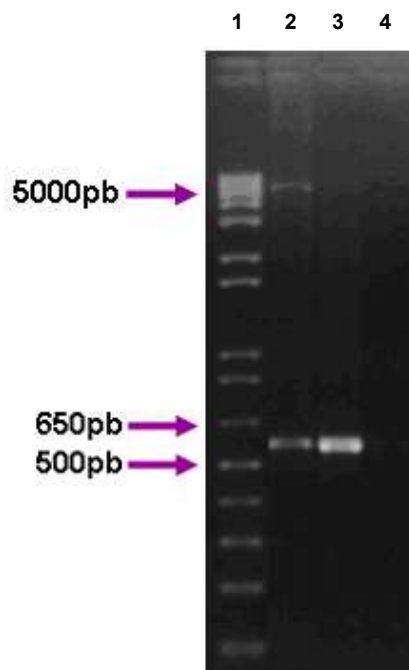


Figura 4.5 – Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fatores *sigma C* através de um ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores sigCe_F – sigCe_R. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) (canaleta 1); DNA genômico da linhagem mutante para o fator *sigma C* a partir do qual é gerado um fragmento de 4866 pb (canaleta 2); DNA genômico da linhagem 1002 selvagem a partir do qual é gerado um fragmento de 564 pb (canaleta 3); controle negativo (canaleta 4).

A utilização do pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®), um plasmídeo suicida em *C. pseudotuberculosis*, para a produção de linhagens mutantes, se mostrou um método bastante eficiente, sendo possível a obtenção de linhagens deficientes para os fatores *sigma* alternativos B, C, D, H, K e M através dessa técnica (vide anexo). O emprego de ensaios de PCR, utilizando-se diferentes combinações de iniciadores, permitiu a confirmação da obtenção dessas linhagens mutantes de modo rápido e eficaz sem a necessidade da realização de técnicas mais complexas, como o *Southern blot*.

Assim, as técnicas empregadas neste trabalho poderão ser utilizadas para a produção de linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para determinados genes de virulência ou outros genes cujas funções se deseja estudar. Além disso, através da mutação de genes de virulência, poderão ser obtidas linhagens de *C. pseudotuberculosis* atenuadas, as quais consistirão em bons candidatos vacinais contra a linfadenite caseosa.

A obtenção de linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para os fatores *sigma* alternativos B, C, D, H, K e M neste trabalho e a obtenção de uma linhagem

deficiente para o fator *sigma* E por Pacheco (2010) abrem grandes perspectivas para o estudo da regulação da expressão gênica em *C. pseudotuberculosis*. Através do estudo do transcriptoma destas linhagens mutantes será possível descobrir quais genes são regulados por cada fator *sigma* alternativo, e deste modo, construir uma rede regulatória da expressão gênica nesta bactéria, a qual deve envolver inclusive a regulação de um fator *sigma* por outro, e a regulação de outros fatores transcricionais por fatores *sigma* alternativos. Além disso, muitos dos genes regulados pelos fatores *sigma* alternativos devem consistir em genes de virulência ou em genes associados à virulência, de modo que o estudo do transcriptoma destas linhagens permitirá a identificação de novos fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis*, os quais consistirão em possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas, testes de diagnóstico e tratamentos mais eficazes para a linfadenite caseosa.

Estudos posteriores que visem à análise da virulência destas linhagens mutantes em macrófagos e em camundongos poderão nos informar se estas são ou não atenuadas em relação à linhagem selvagem. Se a interrupção dos fatores *sigma* alternativos tiverem tornado estas linhagens atenuadas, elas poderão ser testadas como possíveis vacinas contra a linfadenite caseosa. Além disso, poderão ser construídas linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para mais de um fator *sigma* alternativo na tentativa de se obter linhagens ainda mais atenuadas, e conseqüentemente, melhores candidatos vacinais (Sun *et al.*, 2004; Sachdeva *et al.*, 2009).

4.4 Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C

Na figura 4.6 podemos visualizar as curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C, construídas através de leituras de densidade ótica (DO_{600nm}) das culturas em triplicata, a cada hora, durante 15 horas. Não foi observada uma diferença significativa entre estas curvas de crescimento, indicando que a deficiência do fator *sigma* C não afeta o crescimento da linhagem mutante.

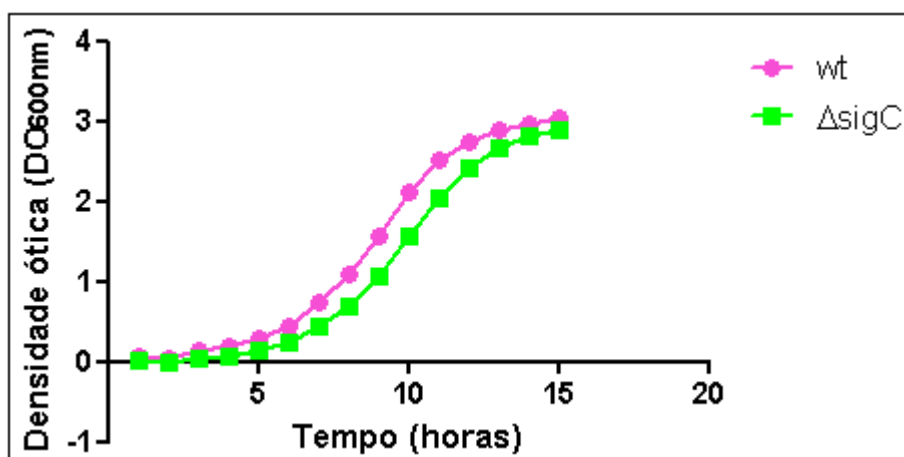


Figura 4.6 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC).

4.5 Resistência das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C às condições de estresse *in vitro*

Após a obtenção de linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para os fatores *sigma* alternativos B, C, D, H, K e M, nós escolhemos a linhagem deficiente para o fator *sigma* C para avaliar a resistência desta a diferentes condições de estresse ambiental *in vitro*, com a finalidade de verificar se este fator *sigma* regula a expressão de genes que são importantes para a resposta a estas condições de estresse e para a virulência da bactéria.

A linhagem mutante para o fator *sigma* C foi selecionada dentre as demais devido ao fato de que o fator *sigma* C tem sido associado à virulência em *M. tuberculosis*, uma bactéria filogeneticamente próxima de *C. pseudotuberculosis*, como demonstraram Sun e cols (2004), Karls e cols (2006) e Abdul-Majid e cols (2008), os quais verificaram que linhagens de *M. tuberculosis* mutantes para o fator *sigma* C são significativamente atenuadas em relação à linhagem selvagem. Além disso, a seleção desta linhagem também se deveu ao fato de ter sido verificado, através de análises *in silico* realizadas por nosso grupo de pesquisa, que o gene que codifica o fator *sigma* C se encontra em uma ilha de patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*, o que sugere que este fator *sigma* deve desempenhar um papel importante para a virulência da bactéria.

Através de um estudo de microarranjo genômico em uma linhagem de *M. tuberculosis* mutante para o fator *sigma* C, Sun e cols (2004) observaram que o fator *sigma* C regula a expressão de vários genes associados à virulência nesta bactéria, incluindo os genes *hspX*, *senX3*, *mtrA* e *fbpC*, os quais codificam um homólogo de α -

cristalina, um sensor histidina kinase de dois componentes, um regulador transcricional de dois componentes e o antígeno 85C, respectivamente, o que também demonstra a importância deste fator *sigma* para a virulência da bactéria.

Assim, nós avaliamos a resistência da linhagem mutante para o fator *sigma* C aos estresses oxidativo, ácido, osmótico e térmico, os quais consistem em condições de estresse que *C. pseudotuberculosis* normalmente encontra no meio ambiente e no interior do organismo hospedeiro, e às quais esta bactéria precisa responder de modo rápido e eficaz para conseguir sobreviver, proliferar e causar uma infecção bem-sucedida.

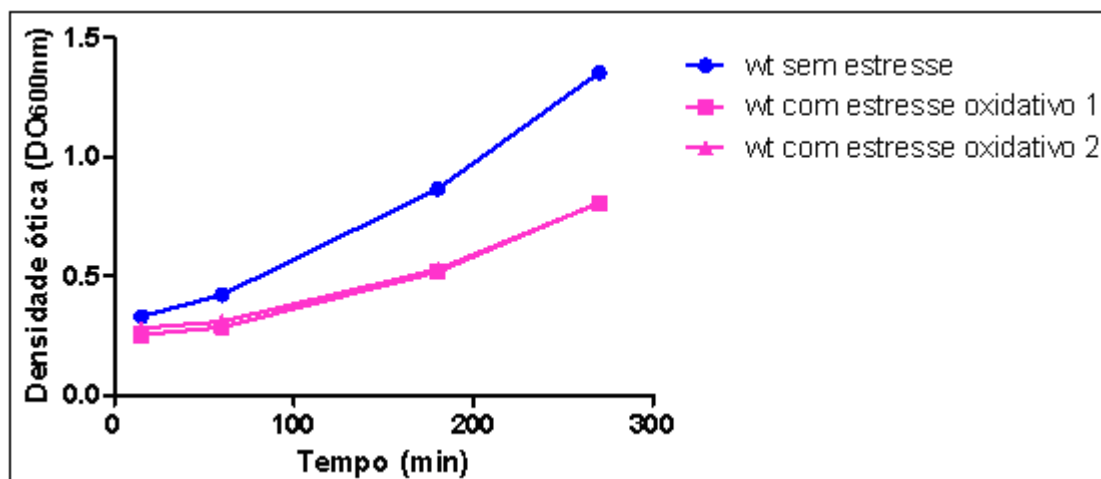
4.5.1 Resistência das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C ao estresse oxidativo

Espécies reativas do oxigênio (ROS) são formadas nos organismos aeróbios como subprodutos do metabolismo celular, como resultado da redução parcial do oxigênio molecular (O_2) para ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH \cdot) (Merkamm e Guyonvarch, 2001). Em bactérias, a maioria das ROS é gerada pelas enzimas da cadeia respiratória associada à membrana plasmática, responsáveis pela redução sequencial do oxigênio molecular. Além das ROS produzidas endogenamente, as bactérias são frequentemente expostas aos radicais oxidativos presentes no ambiente extracelular, como as ROS produzidas pelos macrófagos como uma defesa do organismo à invasão do patógeno. Quando a quantidade de ROS é superior à que a célula é capaz de neutralizar em condições fisiológicas normais, é caracterizada a condição de estresse oxidativo. Quando é estabelecido este tipo de estresse, o organismo se esforça para manter o ambiente citoplasmático redutor, através da ativação de vários mecanismos de tolerância ao estresse oxidativo, como a produção de enzimas redutoras de dissulfetos, catalases (ou peroxidases) e superóxido dismutases, visando à integridade de diversos componentes celulares que são vulneráveis às ROS, como os lipídeos da membrana plasmática, as proteínas e o DNA (Cabiscol *et al.*, 2000; Ehrt e Schnappinger, 2009).

Nas figuras 4.7 e 4.9 podemos visualizar as curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C construídas, respectivamente, através de leituras de densidade ótica (DO_{600nm}) das culturas em triplicata e de plaqueamento de diluições seriadas das culturas em duplicata, para os tempos 15, 60, 180 e 270 minutos após a adição do agente gerador do estresse oxidativo (H_2O_2 70mM).

Nas figuras 4.8 e 4.10 podemos visualizar, respectivamente, o crescimento relativo e a viabilidade relativa das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H_2O_2 70mM) em relação às bactérias crescidas sob condições normais.

A



B

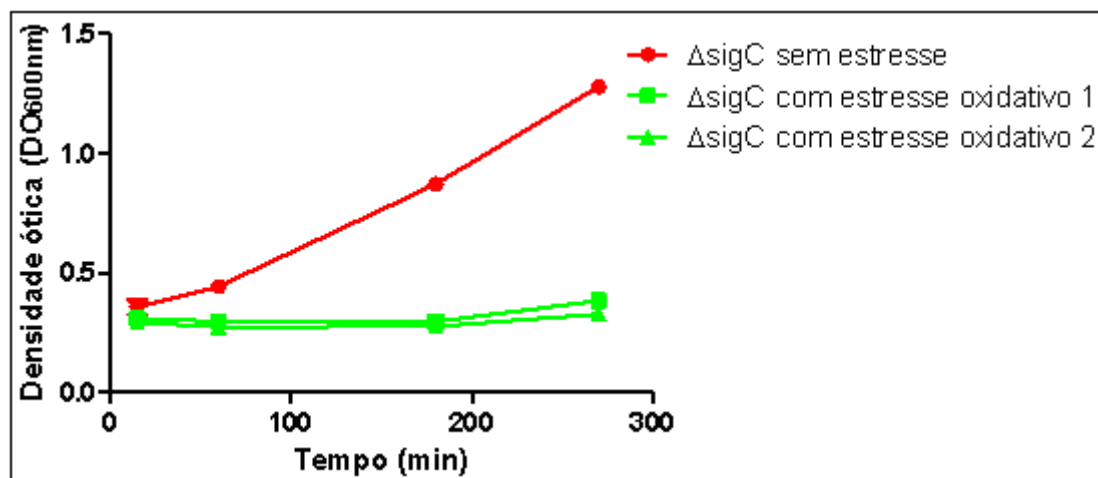


Figura 4.7 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H_2O_2 70mM) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma* C.

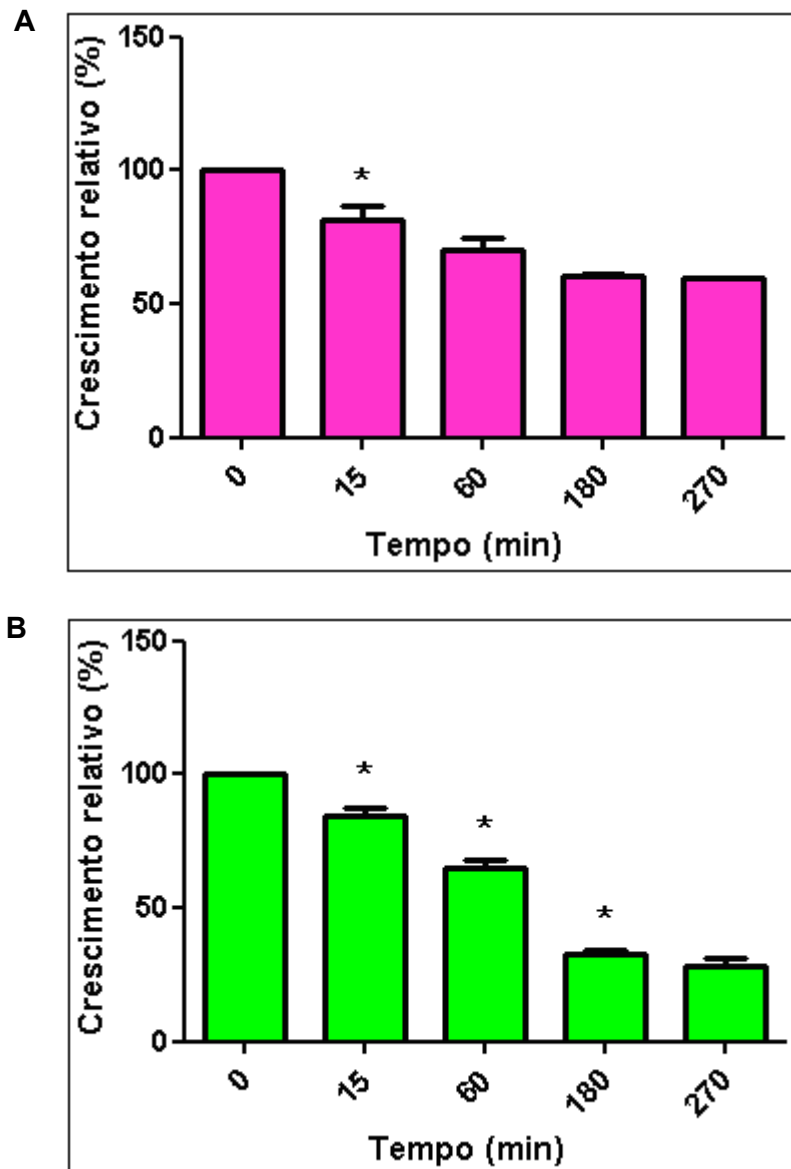
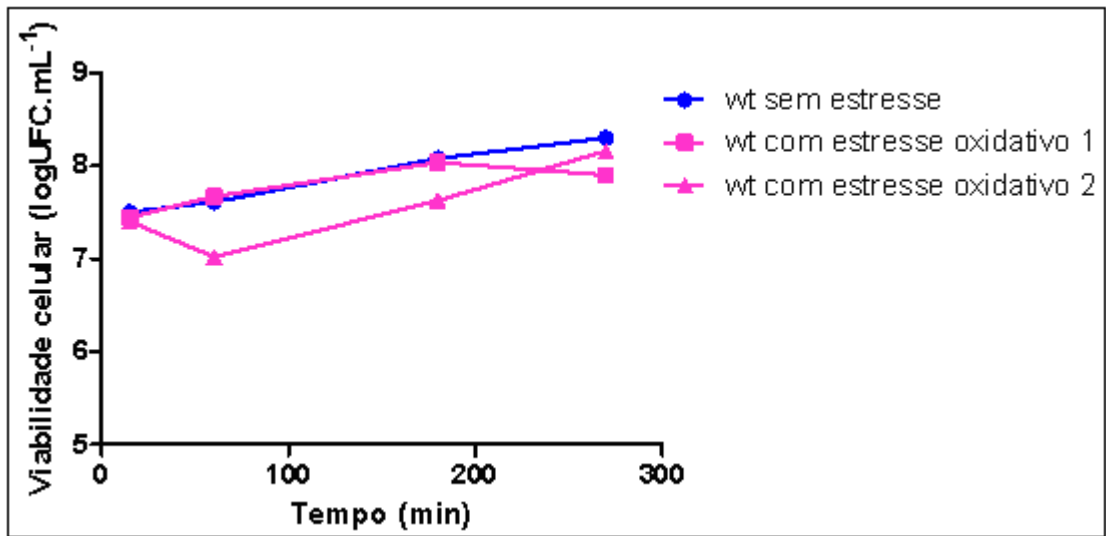


Figura 4.8 – Crescimento relativo das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H_2O_2 70mM) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma* C. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student em que foi analisada a diferença no crescimento relativo entre os tempos sucessivos de exposição de cada linhagem ao agente gerador de estresse.

A



B

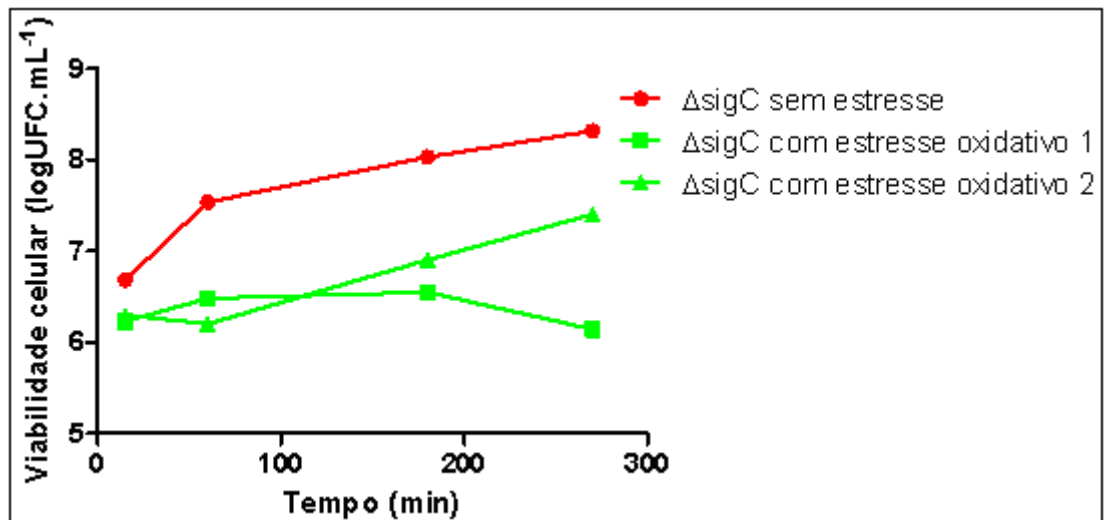


Figura 4.9 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma C* (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H_2O_2 70mM) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma C*.

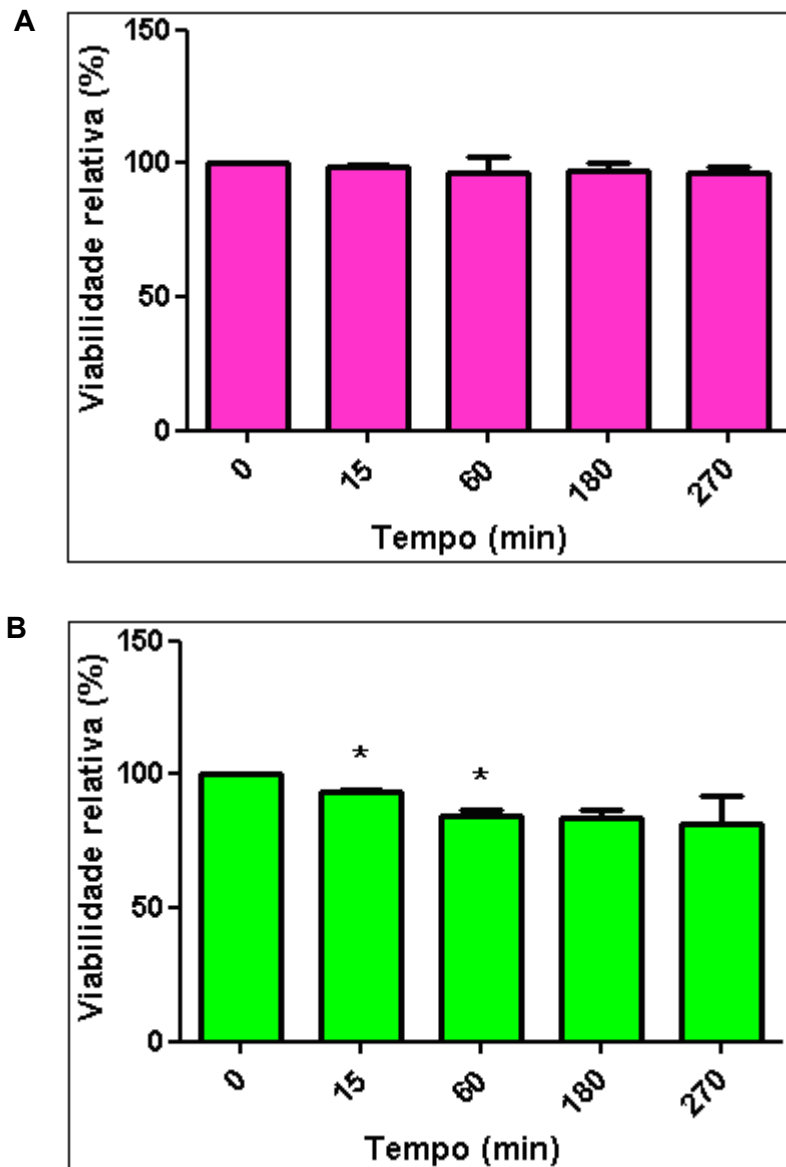


Figura 4.10 – Viabilidade relativa das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse oxidativo (H_2O_2 70mM) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma* C. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student em que foi analisada a diferença na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição de cada linhagem ao agente gerador de estresse.

Após analisar as diferenças no crescimento relativo entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C ao estresse oxidativo, utilizando-se o Teste T de Student, foi observado que esta condição de estresse afeta o crescimento das duas linhagens inicialmente, tendo sido

observada uma redução significativa do crescimento destas linhagens 15 minutos após a adição do agente gerador do estresse oxidativo. Contudo, foi observado que a linhagem selvagem retorna o crescimento após 60 minutos de exposição ao estresse oxidativo, enquanto que o crescimento da linhagem mutante continua diminuindo de modo significativo após 60 e 180 minutos de exposição ao estresse oxidativo e se mantém reduzido após 270 minutos de exposição a esta condição de estresse.

Após analisar as diferenças na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* ao estresse oxidativo, utilizando-se o Teste T de Student, foi observado que esta condição de estresse afeta a viabilidade apenas da linhagem mutante, tendo sido observada uma redução significativa da viabilidade desta linhagem 15 e 60 minutos após a adição do agente gerador do estresse oxidativo e a viabilidade ainda se mantém reduzida 180 e 270 minutos após a exposição a esta condição de estresse.

Assim, podemos sugerir que o fator *sigma C* deve desempenhar um papel importante para uma resposta tardia ao estresse oxidativo, já que o crescimento de ambas as linhagens é afetado imediatamente após a exposição a esta condição de estresse, mas a linhagem selvagem consegue superar os efeitos gerados pelo estresse oxidativo e retorna o crescimento após 60 minutos de exposição ao estresse, enquanto que a linhagem mutante, supostamente devido à deficiência do fator *sigma C*, não consegue superar os efeitos gerados pelo estresse oxidativo e não retorna o seu crescimento normal.

Além disso, após suspender a exposição ao estresse oxidativo, a linhagem selvagem retorna o seu crescimento normal, de modo que a viabilidade desta linhagem não é afetada, enquanto que a linhagem mutante não consegue superar os efeitos gerados pelo estresse oxidativo e não retorna o seu crescimento normal, de modo que é observada uma redução significativa na viabilidade desta linhagem.

Como a linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma C* se mostrou significativamente mais susceptível ao estresse oxidativo do que a linhagem selvagem, nós podemos sugerir que o fator *sigma C* deve desempenhar um papel importante para a resposta da bactéria a esta condição de estresse, e possivelmente, para a sua sobrevivência no interior do ambiente extremamente oxidativo dos macrófagos e para a sua virulência. Provavelmente, este fator *sigma* deve regular a expressão de genes associados à virulência que são importantes para a resposta ao estresse oxidativo e para a sobrevivência da bactéria no interior do fagolisossomo dos macrófagos. Estudos posteriores que visem analisar a persistência e a virulência desta linhagem em macrófagos e em camundongos poderão confirmar a importância do fator *sigma C* para a sobrevivência e a virulência da bactéria. Através destes estudos,

também será possível verificar se a linhagem mutante para o fator *sigma* C é atenuada em relação à linhagem selvagem, e se ela consiste em um possível candidato vacinal contra a linfadenite caseosa.

Através da determinação dos níveis transcricionais dos genes que codificam os fatores *sigma* alternativos de *C. pseudotuberculosis* após a exposição desta ao estresse oxidativo, Castro (2009) verificou que ocorre um aumento significativo da expressão do gene que codifica o fator *sigma* C 15 minutos após a exposição da bactéria a esta condição de estresse, o que corrobora a importância deste fator *sigma* para a resposta ao estresse oxidativo nesta bactéria.

Outros estudos relataram que linhagens de *C. glutamicum* deficientes para os fatores *sigma* H e M se mostraram mais susceptíveis do que a linhagem selvagem ao estresse oxidativo (Kim *et al.*, 2005; Nakunst *et al.*, 2007) e que linhagens de *M. tuberculosis* mutantes para os fatores *sigma* E e H também se tornaram mais sensíveis a esta condição de estresse (Manganelli *et al.*, 2001; Manganelli *et al.*, 2002), o que demonstra a importância dos fatores *sigma* alternativos para a resposta bacteriana ao estresse oxidativo.

4.5.2 Resistência das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C ao estresse ácido

C. pseudotuberculosis, ao contrário de *M. tuberculosis* e de *B. abortus*, não impede a fusão entre o fagossomo e o lisossomo dos macrófagos. Assim, esta bactéria intracelular facultativa deve ser capaz de resistir ao ambiente extremamente hostil do fagolisossomo, que é caracterizado pela presença de baixo pH, alta atividade proteolítica e grande potencial oxidativo (Tashjian & Campbell, 1983; Rohde *et al.*, 2007; McKean *et al.*, 2007b). Deste modo, *C. pseudotuberculosis* precisa desenvolver uma resposta adaptativa rápida e eficaz ao estresse ácido, através da ativação de diversos mecanismos, como a exportação de prótons, a descarboxilação de aminoácidos, a mudança na composição de ácido graxo do envelope celular, a síntese de proteínas de reparo do DNA e a produção de compostos básicos, para evitar a ocorrência de danos aos componentes celulares e ao fluxo metabólico celular devido ao baixo pH citoplasmático (Ehrt e Schnappinger, 2009).

Nas figuras 4.11 e 4.13 podemos visualizar as curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C construídas, respectivamente, através de leituras de densidade ótica (DO_{600nm}) das culturas em triplicata e de plaqueamento de diluições seriadas das culturas em

duplicata, para os tempos 15, 60, 180 e 270 minutos após a adição do agente gerador do estresse ácido (pH 5,0).

Nas figuras 4.12 e 4.14 podemos visualizar, respectivamente, o crescimento relativo e a viabilidade relativa das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em relação às bactérias crescidas sob condições normais.

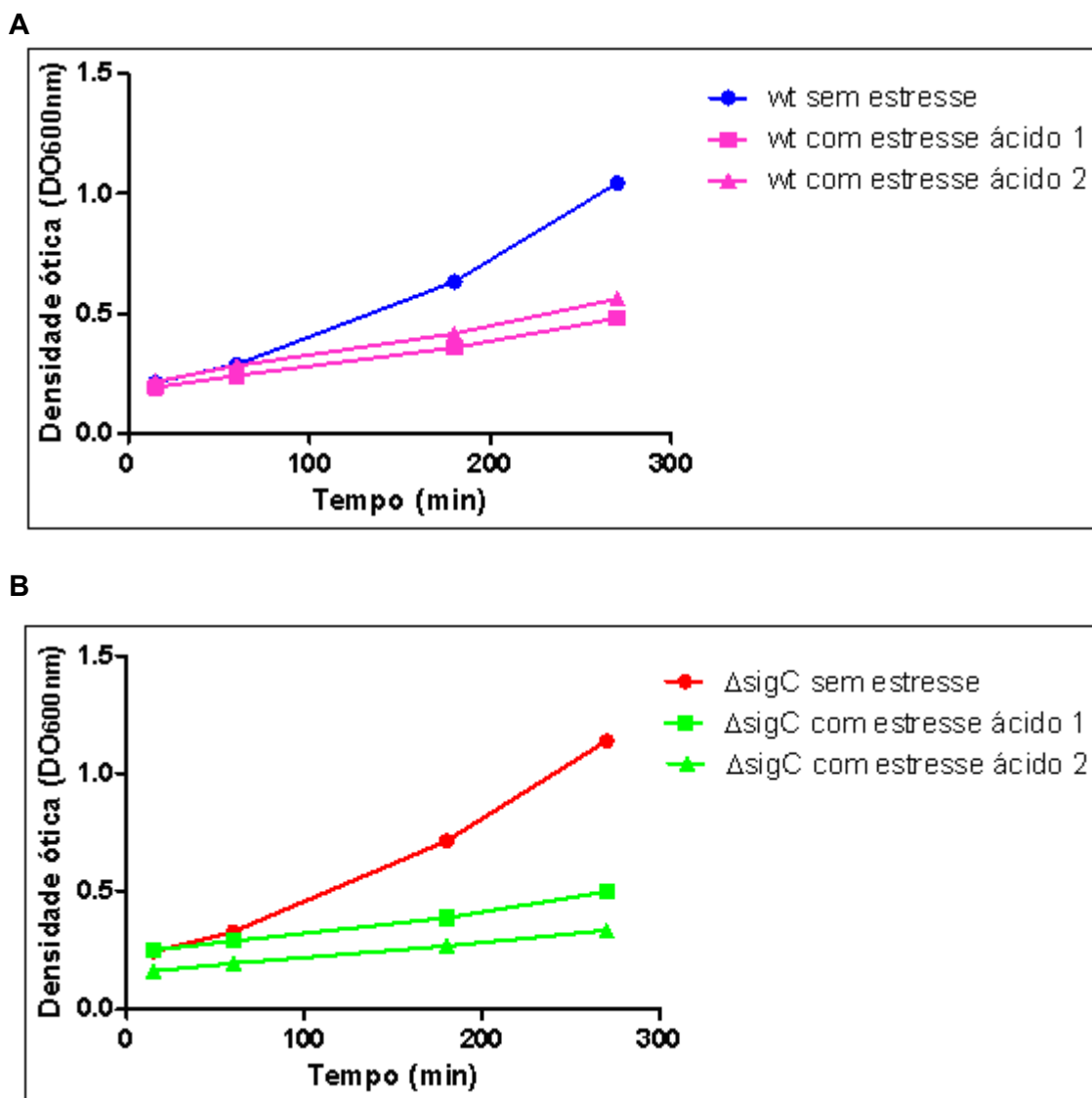


Figura 4.11 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma C* (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma C*.

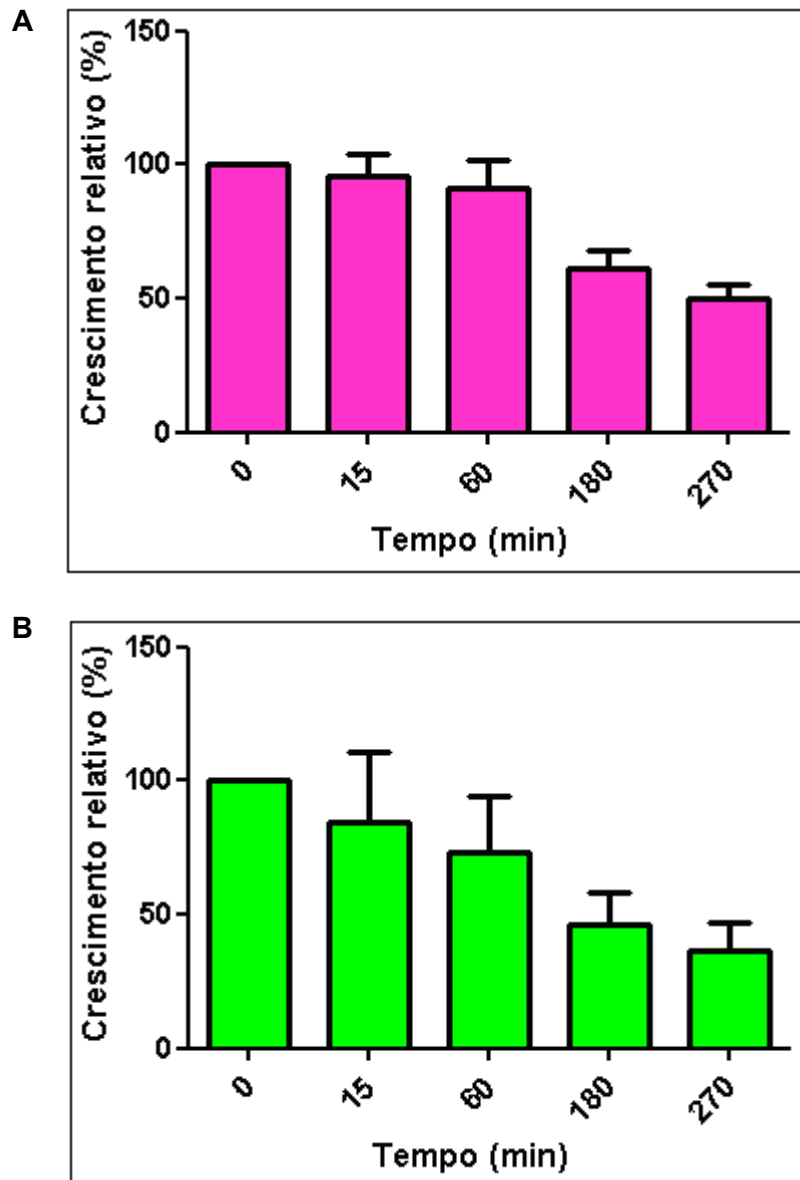
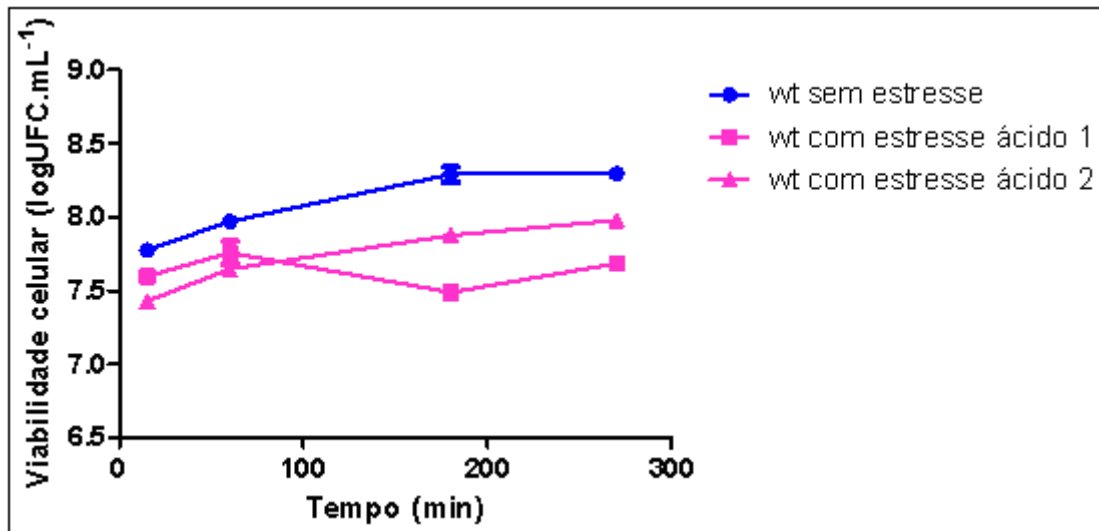


Figura 4.12 – Crescimento relativo das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma* C. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student em que foi analisada a diferença no crescimento relativo entre os tempos sucessivos de exposição de cada linhagem ao agente gerador de estresse.

A



B

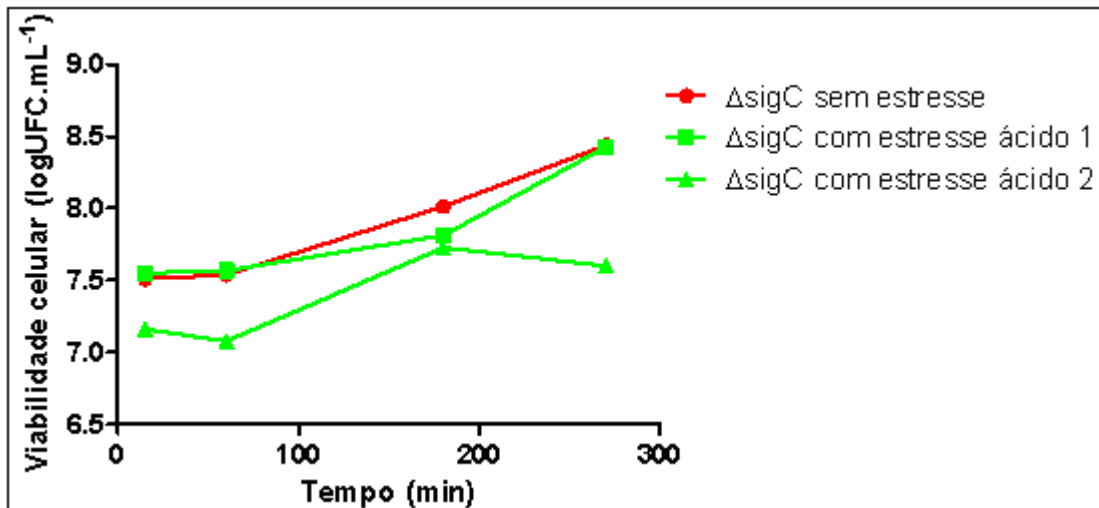


Figura 4.13 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma C* (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma C*.

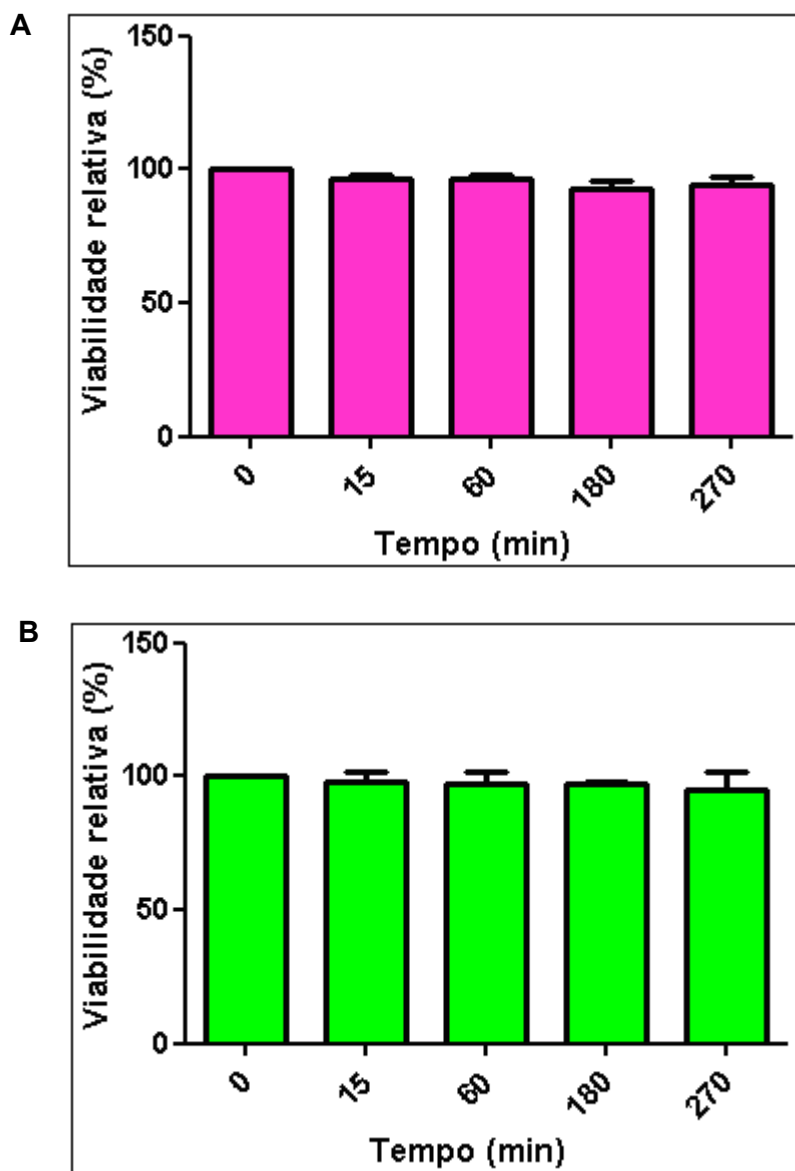


Figura 4.14 – Viabilidade relativa das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma C* (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse ácido (pH 5,0) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma C*. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student em que foi analisada a diferença na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição de cada linhagem ao agente gerador de estresse.

Após analisar as diferenças no crescimento relativo e na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* ao estresse ácido, utilizando-se o Teste T de Student, foi

observado que esta condição de estresse afeta igualmente o crescimento das duas linhagens e não afeta a viabilidade destas linhagens.

Assim, podemos sugerir que o fator *sigma* C não deve desempenhar um papel essencial para a resposta da bactéria ao estresse ácido, ou que outros fatores *sigma* alternativos devem atuar, juntamente com o fator *sigma* C, na resposta a esta condição de estresse, compensando deste modo, a deficiência deste. Isto é possível porque diferentes genes que atuam na resposta a uma mesma condição de estresse podem ser regulados por diferentes fatores *sigma*, como ocorre com os fatores *sigma* X e W de *B. subtilis* (Helmann, 2002). Além disso, alguns fatores *sigma* possuem especificidade promotora muito semelhante, de modo que o mesmo promotor pode ser reconhecido por mais de um fator *sigma*, como os fatores *sigma* E e H de *M. tuberculosis* que se ligam a um mesmo promotor para ativar a transcrição do gene *sigB*; e um único gene ainda pode apresentar múltiplos promotores, sendo reconhecido por diferentes fatores *sigma*, como ocorre com os fatores *sigma* E e F de *M. tuberculosis* na ativação da transcrição do gene *sigB* (Sachdeva *et al.*, 2009).

4.5.3 Resistência das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C ao estresse osmótico

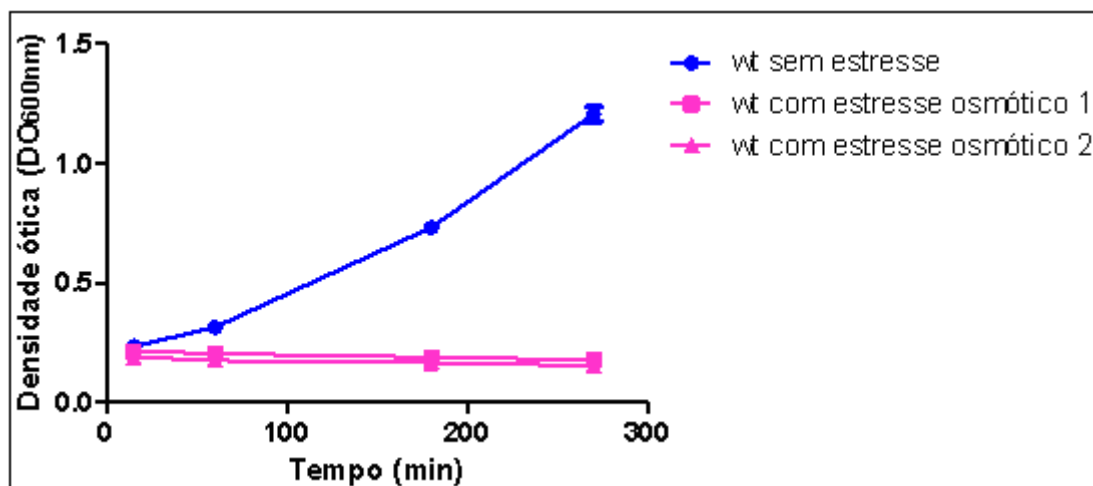
O estresse osmótico ocorre quando a concentração de solutos no meio é maior do que a concentração destes no interior da célula bacteriana, acarretando a desidratação desta e a redução do volume citoplasmático e celular. A desidratação da célula ocasionada pelo estresse osmótico resulta em inibição do crescimento bacteriano, pois ela é acompanhada de um aumento na concentração de todos os metabólitos intracelulares, o que leva a uma inibição do metabolismo celular. Assim, a capacidade de adaptação das bactérias ao aumento da osmolaridade do meio é muito importante para a sobrevivência destas e tem sido associada à virulência em algumas bactérias patogênicas. As bactérias respondem ao estresse osmótico através do aumento da captação ou da síntese de determinados solutos, chamados de solutos compatíveis, os quais não inibem os processos celulares vitais. Deste modo, através do aumento da concentração destes solutos no citoplasma, a célula é reidratada e as concentrações dos metabólitos intracelulares não atingem níveis que possam inibir o crescimento bacteriano (Rajvanshi e Venkatesh, 2010).

Nas figuras 4.15 e 4.17 podemos visualizar as curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C construídas, respectivamente, através de leituras de densidade ótica (DO_{600nm}) das culturas em triplicata e de plaqueamento de diluições seriadas das culturas em

duplicata, para os tempos 15, 60, 180 e 270 minutos após a adição do agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M).

Nas figuras 4.16 e 4.18 podemos visualizar, respectivamente, o crescimento relativo e a viabilidade relativa das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em relação às bactérias crescidas sob condições normais.

A



B

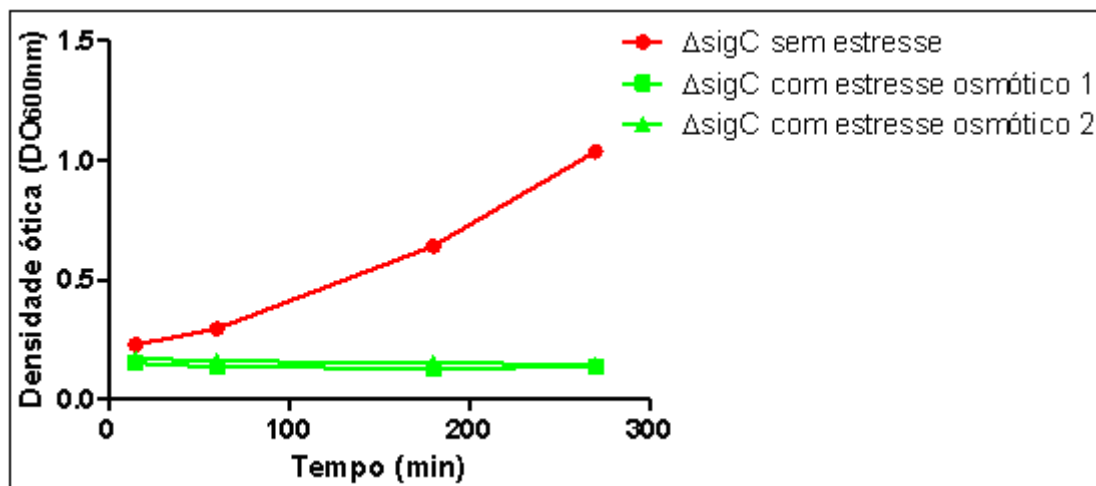


Figura 4.15 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma* C.

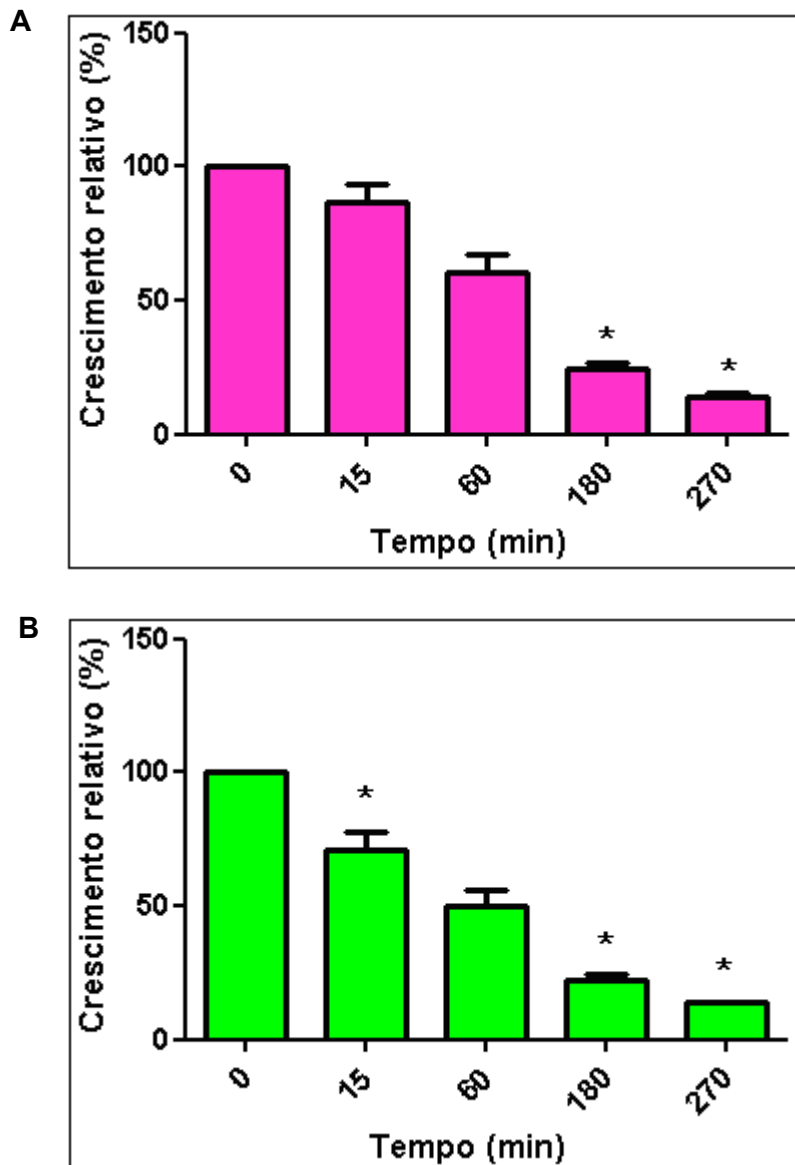
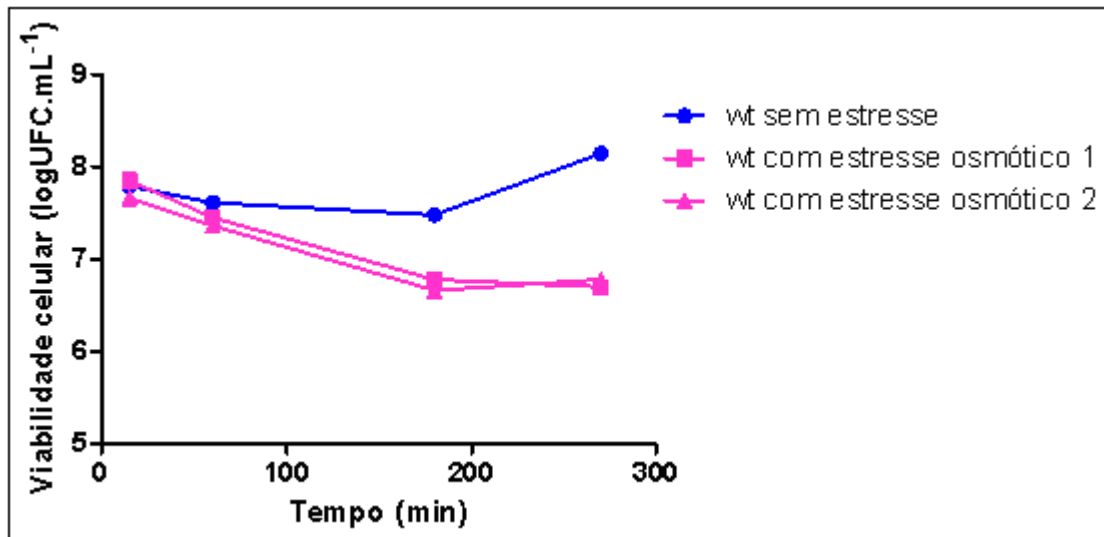


Figura 4.16 – Crescimento relativo das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma* C. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student em que foi analisada a diferença no crescimento relativo entre os tempos sucessivos de exposição de cada linhagem ao agente gerador de estresse.

A



B

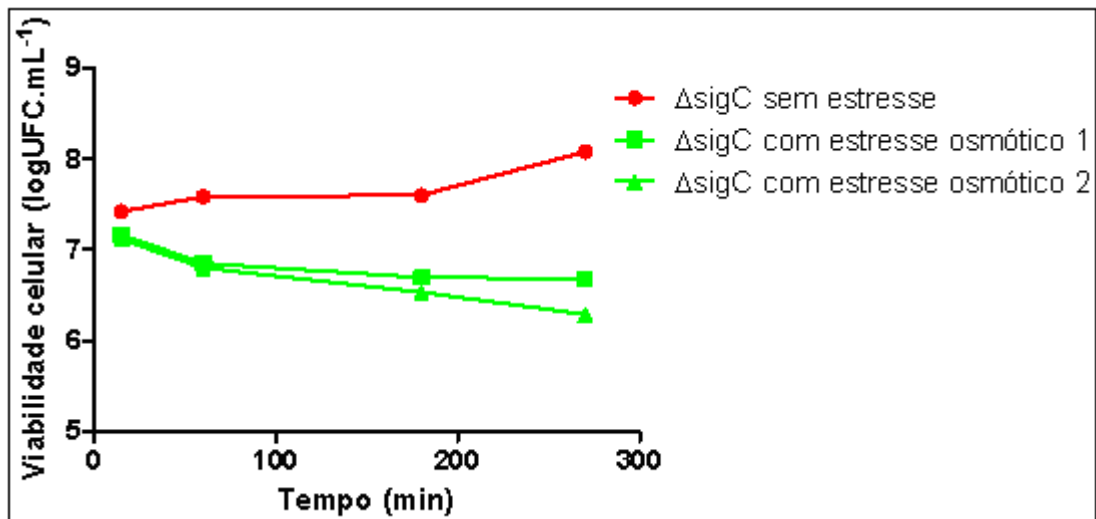


Figura 4.17 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma C* (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma C*.

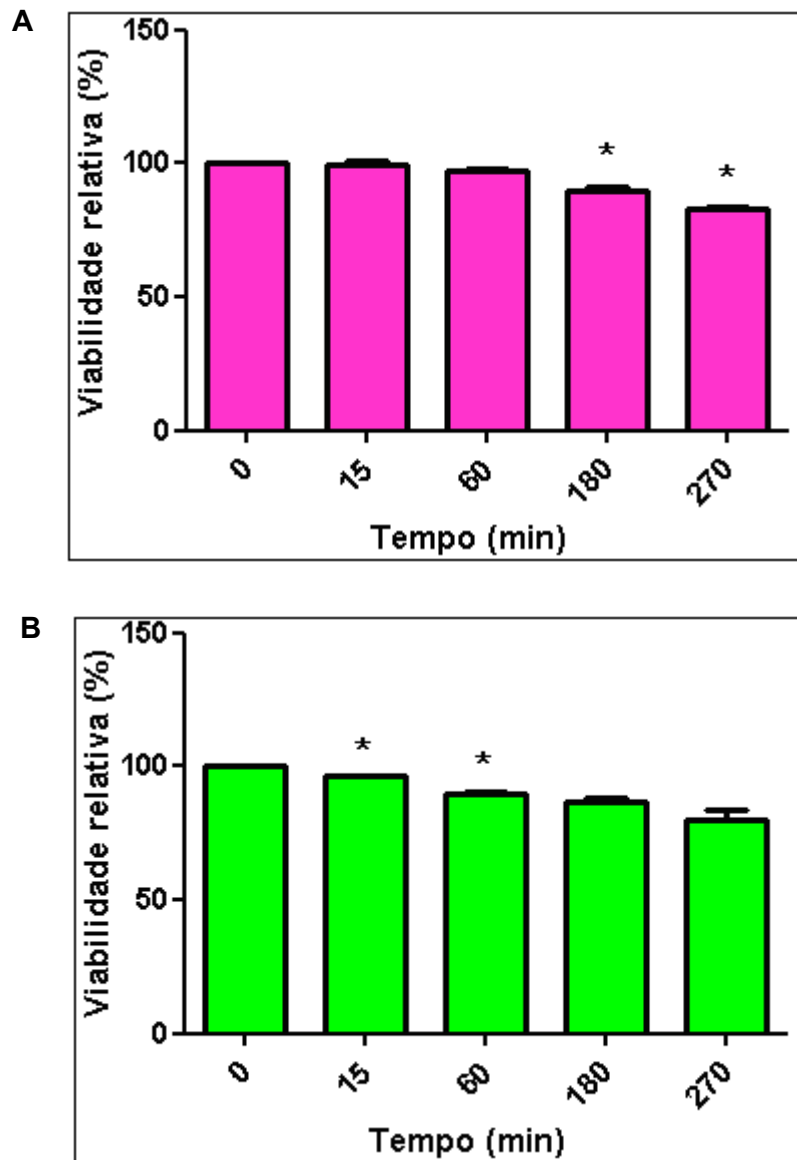


Figura 4.18 – Viabilidade relativa das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse osmótico (NaCl 2,0M) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma* C. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student em que foi analisada a diferença na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição de cada linhagem ao agente gerador de estresse.

Após analisar as diferenças no crescimento relativo entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C ao estresse osmótico, utilizando-se o Teste T de Student, foi observado que esta condição de estresse afeta de modo significativo o crescimento das duas linhagens 180 e 270 minutos após a exposição ao agente gerador do estresse osmótico;

contudo, também ocorre uma redução significativa no crescimento da linhagem mutante 15 minutos após a exposição ao estresse osmótico, o que não é observado com a linhagem selvagem, o que indica que a linhagem mutante sofre os efeitos gerados pelo estresse osmótico mais cedo do que a linhagem selvagem.

Após analisar as diferenças na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C ao estresse osmótico, utilizando-se o Teste T de Student, foi observado que a viabilidade da linhagem mutante é afetada por esta condição de estresse mais precocemente do que a viabilidade da linhagem selvagem, sendo que ocorreu uma redução significativa na viabilidade da linhagem mutante 15 e 60 minutos após a exposição ao estresse osmótico, enquanto que só ocorreu uma redução significativa na viabilidade da linhagem selvagem 180 e 270 minutos após a exposição a esta condição de estresse.

Assim, podemos sugerir que o fator *sigma* C deve desempenhar um papel importante para uma resposta precoce ao estresse osmótico, já que o crescimento da linhagem mutante é afetado imediatamente após a exposição a esta condição de estresse, o que não é observado com a linhagem selvagem.

Além disso, após suspender a exposição ao estresse osmótico, a linhagem mutante não consegue superar os efeitos gerados por esta condição de estresse, de modo que ocorre uma redução significativa na viabilidade desta linhagem 15 e 60 minutos após a exposição ao estresse osmótico, enquanto que a linhagem selvagem consegue superar os efeitos gerados por esta condição de estresse inicialmente, ocorrendo uma redução significativa na viabilidade desta linhagem somente 180 e 270 minutos após a exposição ao estresse osmótico.

Como a linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* C se mostrou significativamente mais susceptível ao estresse osmótico do que a linhagem selvagem, nós podemos sugerir que o fator *sigma* C deve desempenhar um papel importante para a resposta da bactéria a esta condição de estresse e para a sua capacidade de adaptação ao aumento da osmolaridade do meio. Provavelmente, este fator *sigma* deve regular a expressão de genes associados à virulência que são importantes para a resposta ao estresse osmótico e para a sobrevivência da bactéria diante das variações da osmolaridade que ocorrem no meio ambiente e no interior do hospedeiro.

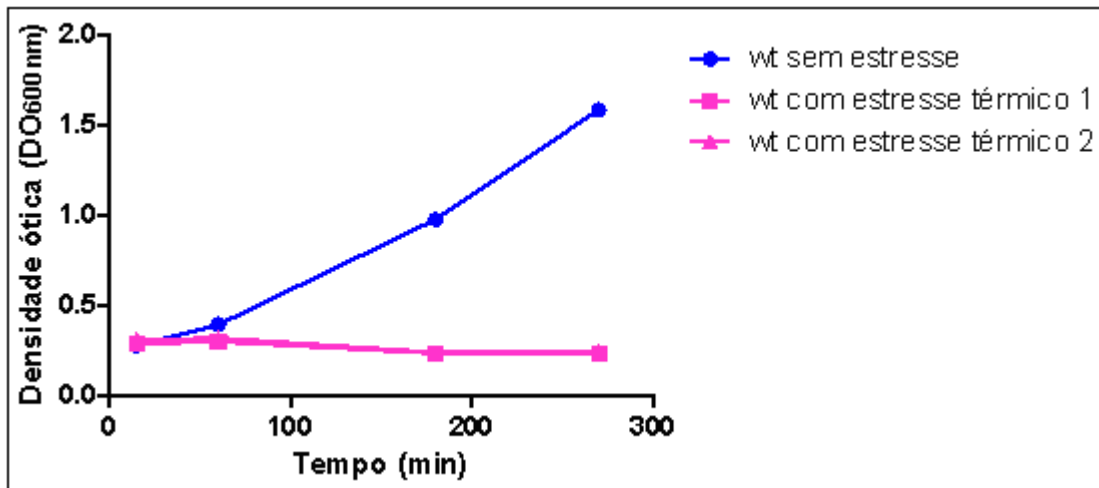
4.5.4 Resistência das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C ao estresse térmico

Quando as bactérias são expostas a temperaturas elevadas, caracterizando a condição de estresse ou choque térmico, ocorrem alterações conformacionais nas proteínas celulares, o que acarreta a exposição das regiões hidrofóbicas destas e a formação de agregados protéicos, os quais danificam a célula bacteriana. Assim, as bactérias precisam impedir a formação destes agregados protéicos através da ativação da transcrição de genes que codificam as proteínas do choque térmico (HSPs), como proteases e chaperones, as quais promovem a degradação das proteínas desnaturadas ou a restauração da conformação adequada destas, respectivamente (Schumann, 2007).

Nas figuras 4.19 e 4.21 podemos visualizar as curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C construídas, respectivamente, através de leituras de densidade ótica (DO_{600nm}) das culturas em triplicata e de plaqueamento de diluições seriadas das culturas em duplicata, para os tempos 15, 60, 180 e 270 minutos após a adição do agente gerador do estresse térmico (50°C).

Nas figuras 4.20 e 4.22 podemos visualizar, respectivamente, o crescimento relativo e a viabilidade relativa das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em relação às bactérias crescidas sob condições normais.

A



B

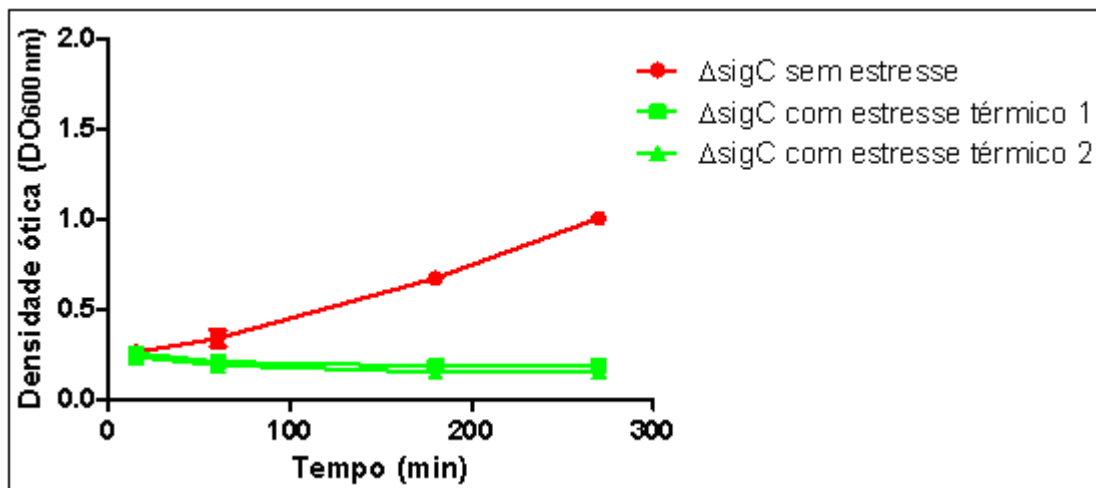


Figura 4.19 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma C* (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma C*.

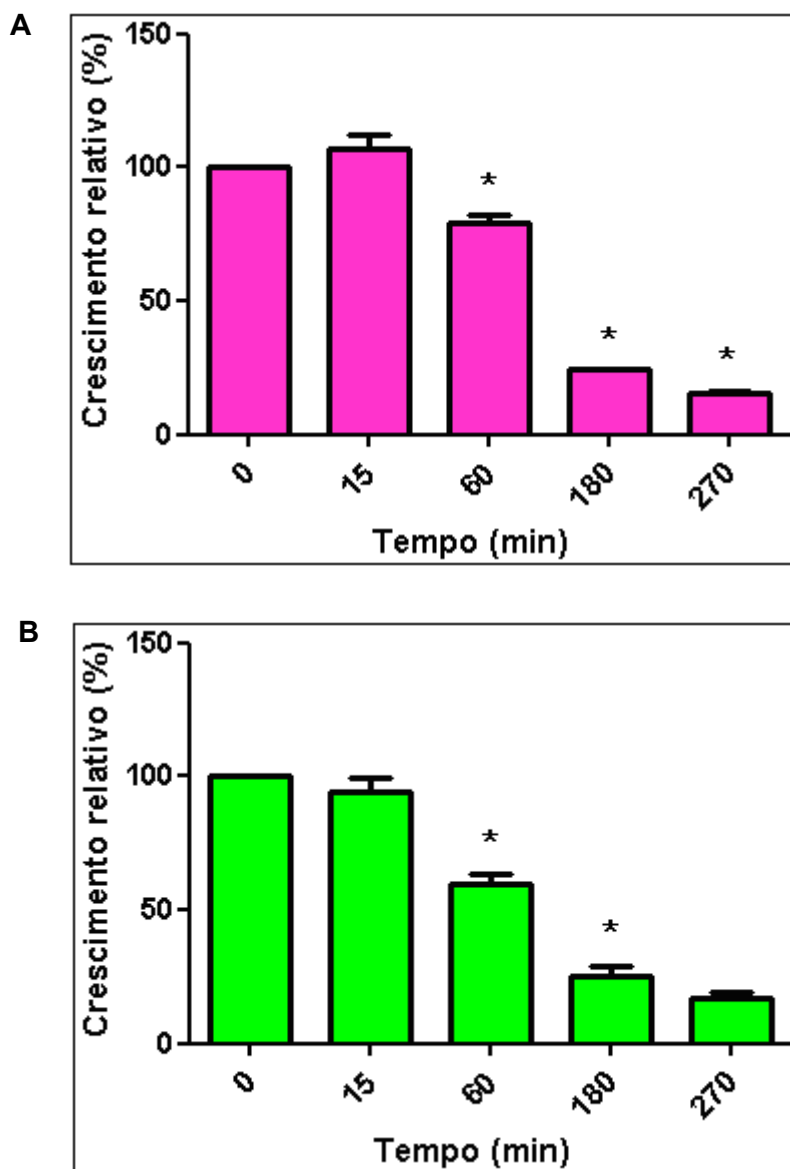
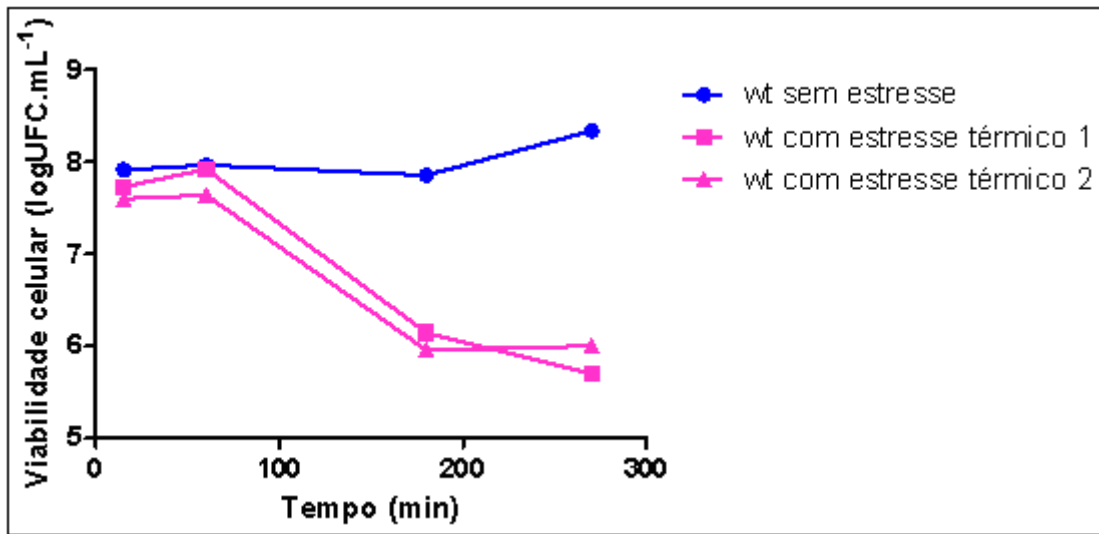


Figura 4.20 – Crescimento relativo das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma* C (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma* C. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student em que foi analisada a diferença no crescimento relativo entre os tempos sucessivos de exposição de cada linhagem ao agente gerador de estresse.

A



B

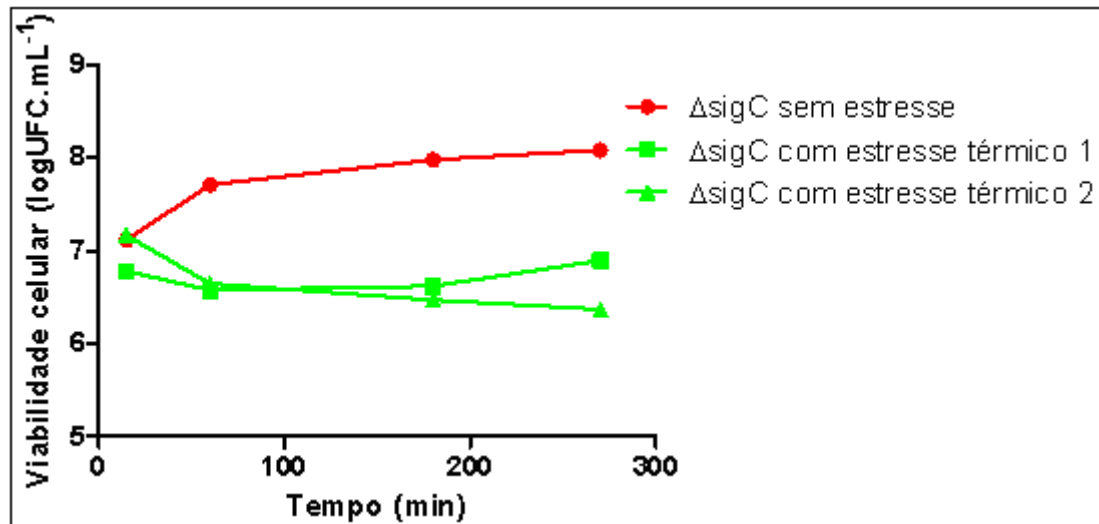


Figura 4.21 – Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma C* (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em duplicata e quando crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma C*.

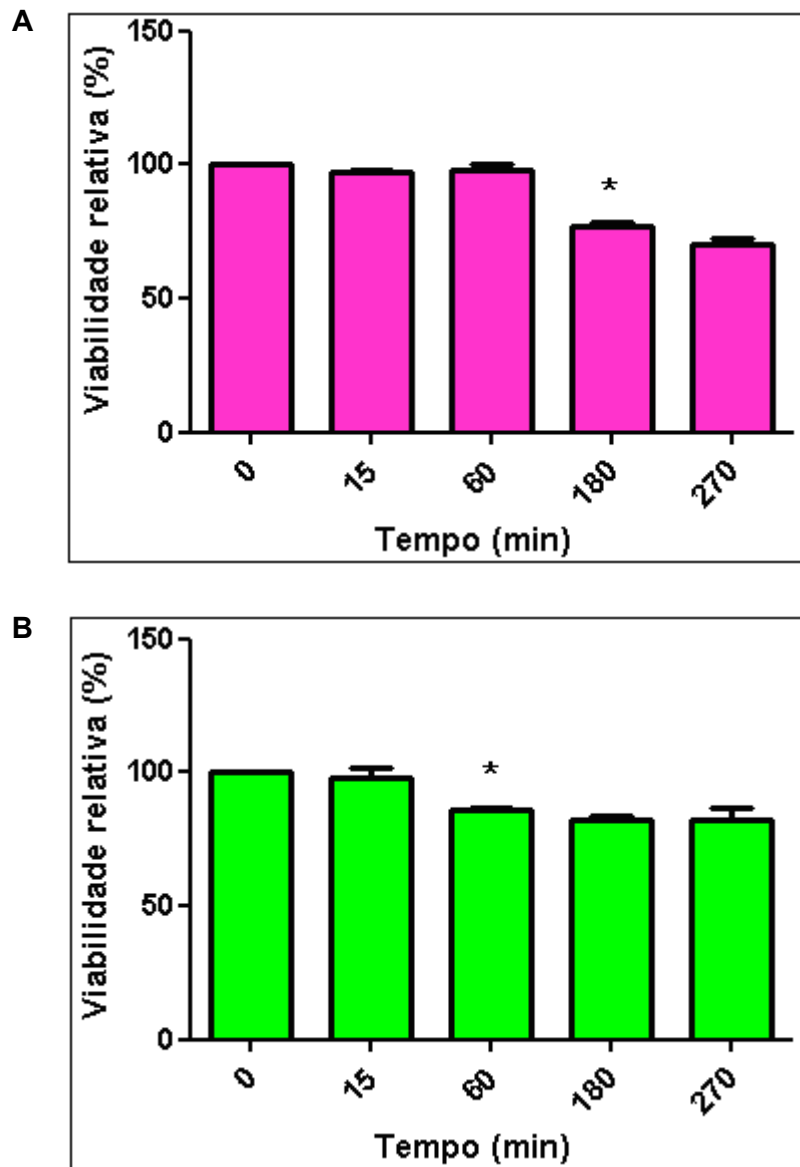


Figura 4.22 – Viabilidade relativa das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante para o fator *sigma C* (Δ sigC) quando expostas ao agente gerador do estresse térmico (50°C) em relação às bactérias crescidas sob condições normais (sem estresse). (A) Linhagem 1002 selvagem. (B) Linhagem mutante para o fator *sigma C*. * indica $p < 0,050$ no teste T de Student em que foi analisada a diferença na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição de cada linhagem ao agente gerador de estresse.

Após analisar as diferenças no crescimento relativo entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma C* ao estresse térmico, utilizando-se o Teste T de Student, foi observado que esta condição de estresse afeta o crescimento das duas linhagens, tendo sido observada

uma redução significativa no crescimento destas linhagens 60 e 180 minutos após a exposição ao estresse térmico.

Após analisar as diferenças na viabilidade relativa entre os tempos sucessivos de exposição das linhagens 1002 selvagem e mutante para o fator *sigma* C ao estresse térmico, utilizando-se o Teste T de Student, foi observado que a viabilidade da linhagem mutante é afetada por esta condição de estresse mais precocemente do que a viabilidade da linhagem selvagem, sendo que ocorreu uma redução significativa na viabilidade da linhagem mutante 60 minutos após a exposição ao estresse térmico, enquanto que só ocorreu uma redução significativa na viabilidade da linhagem selvagem 180 minutos após a exposição a esta condição de estresse.

Assim, podemos sugerir que o fator *sigma* C deve desempenhar um papel importante para uma resposta tardia ao estresse térmico, já que apesar do crescimento de ambas as linhagens ser afetado após a exposição a esta condição de estresse, após suspender a exposição ao estresse térmico, a linhagem mutante não consegue superar os efeitos gerados por esta condição de estresse, de modo que ocorre uma redução significativa na viabilidade desta linhagem 60 minutos após a exposição ao estresse térmico, enquanto que a linhagem selvagem consegue superar os efeitos gerados por esta condição de estresse inicialmente, ocorrendo uma redução significativa na viabilidade desta linhagem somente 180 minutos após a exposição ao estresse térmico.

Como a linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* C se mostrou significativamente mais susceptível ao estresse térmico do que a linhagem selvagem, nós podemos sugerir que o fator *sigma* C deve desempenhar um papel importante para a resposta da bactéria a esta condição de estresse e para a sua capacidade de adaptação ao aumento da temperatura do meio. Provavelmente, este fator *sigma* deve regular a expressão de genes associados à virulência que são importantes para a resposta ao estresse térmico e para a sobrevivência da bactéria diante das variações da temperatura que ocorrem no meio ambiente e no interior do hospedeiro.

Outros trabalhos revelaram que uma linhagem de *L. monocytogenes* mutante para o fator *sigma* C apresentou uma maior susceptibilidade ao estresse térmico do que a linhagem selvagem (Chaturongakul *et al.*, 2008), que linhagens de *C. glutamicum* deficientes para os fatores *sigma* H e M se mostraram mais susceptíveis do que a linhagem selvagem a esta condição de estresse (Kim *et al.*, 2005; Nakunst *et al.*, 2007) e que linhagens de *M. tuberculosis* mutantes para os fatores *sigma* E e H também se tornaram mais sensíveis a este tipo de estresse (Manganelli *et al.*, 2001;

Manganelli *et al.*, 2002), o que demonstra a importância dos fatores *sigma* alternativos para a resposta bacteriana ao estresse térmico.

5. CONCLUSÕES

Através do emprego de um plasmídeo suicida, foi possível a obtenção de linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para os fatores *sigma* alternativos B, C, D, H, K e M, e a obtenção destas linhagens foi confirmada através de ensaios de PCR.

Após avaliar a resistência da linhagem mutante para o fator *sigma* C aos estresses oxidativo, ácido, osmótico e térmico, não foi observada uma diferença significativa na susceptibilidade desta linhagem ao estresse ácido em relação à linhagem 1002 selvagem.

Contudo, foi verificado que esta linhagem é significativamente mais susceptível aos estresses oxidativo, osmótico e térmico do que a linhagem 1002 selvagem, indicando que o fator *sigma* C deve desempenhar um papel importante para a resposta da bactéria a estas condições de estresse, e possivelmente, para a sua sobrevivência no meio ambiente e no interior do hospedeiro e para a sua virulência.

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre perspectivas para:

- Avaliar a resistência das linhagens mutantes para os fatores *sigma* B, D, H, K e M a diferentes condições de estresse *in vitro*;
- Avaliar a persistência da infecção e da virulência das linhagens mutantes para os fatores *sigma* B, C, D, H, K e M em macrófagos e em camundongos;
- Testar as linhagens mutantes que se tornaram atenuadas em relação à linhagem 1002 selvagem como possíveis vacinas contra a linfadenite caseosa;
- Caracterizar o transcriptoma das linhagens mutantes para os fatores *sigma* B, C, D, E, H, K e M quando cultivadas sob condições normais e quando expostas a condições de estresse *in vitro*;
- Analisar os genes diferencialmente expressos nas linhagens mutantes em relação à linhagem 1002 selvagem quando cultivadas sob condições normais e quando expostas a condições de estresse, com a finalidade de identificar os genes que são regulados por cada um dos fatores *sigma* alternativos que são importantes para a resposta às condições de estresse e para a virulência da bactéria;
- Construir uma rede regulatória da expressão gênica pelos fatores *sigma* alternativos em *C. pseudotuberculosis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-MAJID, K.B.; LY, L.H.; CONVERSE, P.J.; GEIMAN, D.E.; McMURRAY, D.N.; BISHAI, W.R. Altered cellular infiltration and cytokine levels during early *Mycobacterium tuberculosis sigC* mutant infection associated with late-stage disease attenuation and milder immunopathology in mice. *BMC Microbiol.*, v. 8, 2008.
- AL-RAWASHDEH, O.F.; AL-QUDAH, K.M. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, v. 47, p. 287–293, 2000.
- ALVES, F.S.F. e PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa: recomendações e medidas profiláticas. *Sociedade Nacional de Agricultura*, ano 100, 1997.
- ANDERSON, D.E.; RINGS, D.M.; PUGH, D.G. *Enfermidades do Sistema Tegumentar*. In: PUGH, D.G. *Clínica de Ovinos e Caprinos*. São Paulo: ROCA, 2004. p. 232-233.
- 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.*, v. 59 , p. 67–81, 2003.
- ASAI, K.; ISHIWATA, K., MATSUZAKI, K.; SADAIE, Y. A Viable *Bacillus subtilis* Strain without Functional Extracytoplasmic Function Sigma Genes. *J. Bacteriol.*, v. 190, p. 2633-2636, 2008.
- AUGUSTINE, J.L.; RENSHAW, H.W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 713–715, 1986.
- AWAD F.J. Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. I. Agglutination test. *Am. J. Vet. Res.*, v. 81, p. 251-253, 1960.
- BAIRD G.J. e FONTAINE M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseus 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. Gen. Evol.*, v. 4, p. 301-308, 2004.
- BELKNAP, E.B. *Enfermidades do Sistema Respiratório*. In: PUGH, D.G. *Clínica de Ovinos e Caprinos*. São Paulo: ROCA, 2004. p. 141.
- BIBERSTEIN, E.L. e HIRSH, D.C. *Corynebactérias; Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes; Rhodococcus equi*. In: HIRSH, D.C. e ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.119-126.
- BIBERSTEIN, E.L.; KNIGHT, H.D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Rec.*, v. 89, p. 691-692, 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.*, v. 208, p. 41–45, 2002.

BINNS S. H., GREEN L. E., BAILEY M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.*, v. 123, p. 169–179, 2007.

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

BRAGA, W.U. Protection in alpacas against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using different bacterial components. *Vet. Microbiol.*, v. 119, p. 297-303, 2007.

BROGDEN, K.A.; CHEDID, L.; CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; SACKS, J. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs. *Am. Vet. Res.*, v. 51, p. 200-202, 1990.

BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; BIBERSTEIN, E.L.; MORSE, S.M. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 1116–1119, 1986.

BUCK, G.A.; CROSS, R.E.; WONG, T.P.; LOERA, J.; GROMAN, N. DNA relationships among some *tox*-bearing corynebacteriophages. *Infect. Immun.*, v. 49, p. 679–684, 1985.

BURREL, D.H. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Res. Vet. Sci.*, v. 28, p. 190-194, 1980a.

BURREL, D.H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *C. ovis* antitoxin. *Res. Vet. Sci.*, v. 28, p. 234-237, 1980b.

BUXTON, A. e FRASER, G. *Corynebacterium*. In: BUXTON, A. e FRASER, G. *Animal Microbiology*. Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1977. p. 177–183.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.*, v. 1, p. 3-8, 2000.

CARMINATTI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.F.; PAULE, B.J.A.; VALE, V.L.; REGIS, L.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R. AND MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *R. Ci. Méd. Biol.*, v. 2, p. 88-93, 2003.

CARNE, H.R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. *J. Path. Bact.*, v. 51, p. 199-212, 1940.

CARNE, H.R. e ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels, *Nature*, v. 271, p. 246-248, 1978.

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. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

CHAPLIN, P.J.; De ROSE, R.; BOYLE, J.S.; McWATERS, P.; KELLY, J.; TENNENT, J.M.; LEW, A.M., SCHERLINCK, J.-P.Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 6434–6438, 1999.

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.

CHATURONGAKUL, S.; RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends. Microbiol.*, v. 8, p. 388-396, 2008.

CIANCIOTTO, N. e GROMAN N. A beta-related corynebacteriophage which lacks a tox allele but can acquire it by recombination with phage. *Infect. Immun.*, v. 49, p. 32-35, 1985.

CIANCIOTTO, N.; RAPPUOLI, R.; GROMAN, N. Detection of homology to the beta bacteriophage integration site in a wide variety of *Corynebacterium* spp. *J. Bacteriol.*, v. 168, p. 103-108, 1986.

COELHO, K. S. Isolamento, clonagem e caracterização molecular do gene *hsp60* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e sua utilização na construção de uma vacina de DNA e de subunidade protéica. 2007. (Dissertação mestrado em genética) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1997.

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

CONNOR, K.M.; QUIRIE, M.M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 2633–2637, 2000.

COYLE, M.B. e LIPSKY, B.A. Coryneform bacteria in infections diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, p. 227–246, 1990.

DERCKSEN, D.P.; BRINKHOF, J.M.A.; DEKKER- NOOREN, T.; VAN MAANEN, K.; BODE, C.F.; BAIRD, G.; KAMP, E.M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.*, v. 75, p. 167–175, 2000.

DOBRINDT, U.; HOCHHUT, B.; HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 2, p. 414-424, 2004.

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.; OLIVIERA, S.C.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *In vivo* insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.72, p. 7368-7372, 2006b.

DORELLA, F.A. Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2009. (Dissertação doutorado em genética) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R. W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Rev.*, v. 8, p. 205-213, 2009.

EGEN, N.B.; CUEVAS, W.; McNAMARA, P.J.; SAMMONS, D.W.; HUMPHREYS, R.; SONGER, J.G. Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.*, v. 50, p. 1319–1322, 1989.

EGGLETON, D.G.; MIDDLETON, H.D.; DOIDGE, C.V.; MINTY, D.W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust. Vet. J.*, v. 68, p. 317-319, 1991.

EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defense against host stresses. *Cell Microbiol.*, v. 8, p. 1170-1178, 2009.

EL-ENBAAWY, M.I.; SAAD, M.M.; SELIM, S.A. Humoral and cellular immune responses of a murine model against *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Egypt.*, v. 12, p. 13-20, 2005.

ELLIS, J.A.; HAWK, D.A.; MILLS, K.W.; PRATT, D.L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 28, p. 303-316, 1991.

ERICKSON, J.W.; GROSS, C.A. Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternative sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.*, v. 9, p. 1462-1471, 1989.

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

FERNÁNDEZ, E.P.; VELA, A.I.; Las HERAS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZGARAYZÁBAL, J.F.; MORENO, M.A. Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 18, p. 571–574, 2001.

FONTAINE, M.C.; BAIRD, G.; CONNOR, K.M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, v. 24, p. 5986-5996, 2006.

FOUET, A.; NAMY, O.; LAMBERT, G. Characterization of the operon encoding the alternative σ^B factor from *Bacillus anthracis* and its role in virulence. *J. Bacteriol.*, v. 182, p. 5036–5045, 2000.

GROMAN, N.; SCHILLER, J.; RUSSELL, J. *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* responses to DNA probes derived from corynephage and *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect. Immun.*, v.45, p. 511–517, 1984.

GUIMARÃES, A.S. Linfadenite caseosa em ovinos: estudo soropidemiológico em Minas Gerais e caracterização bioquímica e molecular de isolados de *C. pseudotuberculosis*. (Tese de doutorado em ciência animal) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

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

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.*, v. 46, p. 47-110, 2002.

HENGST, C.D.; BUTTNER, M.J. Redox control in actinobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 11, p. 1201-1216, 2008.

HODGSON, A.L.; BIRD, P.; NISBET, I.T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.*, v. 172, p. 1256-61, 1990.

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

HODGSON, A.L.M.; TACHEDJIAN, M.; CORNER, L.A.; RADFORD, A.J. Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 5275-5290, 1994.

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

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

HOU, X.-G.; KAWAMURA, Y.; SULTANA, F.; HIROSE, K.; MIYAKE, M.; OTSUKA, Y.; MISAWA, S.; OGURI, T.; YAMAMOTO, H.; EZAKI, T. Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes. *Microbiol. Immunol.*, v. 41, p. 453–460, 1997.

IRWIN M. R.; KNIGHT H. D. Enhanced resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in levamisole-treated mice. *Infection and Immunity*, v. 12, p. 1098-1103, 1975.

JOLLY, R.D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice. *N. Z. Vet. J.*, v. 13, p. 141–147, 1965.

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, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Moléstias Causadas por Bactérias. In: JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia Veterinária*. 6.ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 489-491.

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

KARAOLIS, D.K.; JOHNSON, J.A.; BAILEY, C.C.; BOEDEKER, E.C.; KAPER, J.B.; REEVES, P.R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 95, p. 3134-3139, 1998.

KARLS, R.K.; GUARNER, J.; McMURRAY, D.N.; BIRKNESS, K.A.; QUINN, F.D. Examination of *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor mutants using low-dose aerosol infection of guinea pigs suggests a role for SigC in pathogenesis. *Microbiology*. v. 152, p. 1591-1600, 2006.

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.; WIEDMANN, M.; BOOR KJ. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v. 69, p. 527-43, 2005.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 3925–3931, 2004.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 1934–1936, 2005.

KIM, B.J.; LEE, S.H.; LYU, M.A.; KIM, S.J.; BAI, G.H.; KIM, S.J.; CHAE, G.T.; KIM, E.C.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.H. Identification of *Mycobacterial* species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, p. 1714–1720, 1999.

KIM, T.H.; KIM, H.J.; PARK, J.S.; KIM, Y.; KIM, P.; LEE, H.S. Functional analysis of *sigH* expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 4, p. 1542-1547, 2005.

KNIGHT, H.D. A serologic method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in horses. *Cornell. Vet.*, v.68, p. 220-237, 1978.

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

LEAMASTER, B.R.; SHEN, D.T.; GORHAM, J.R.; LEATHERS, C.W.; WELLS, H.D. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis. Am. J. Vet. Res., v. 48, p. 869-872, 1987.

LIPSKY, B.A.; GOLDBERGER, A.C.; TOMPKINS, L.S.; FLORDE, J.J. Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. Rev. Infect. Dis., v. 4, p. 1220-1235, 1982.

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

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.; SMITH, I. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. Mol. Microbiol., v. 41, p. 423-437, 2001.

MANGANELLI, R.; VOSKUIL, M.I.; SCHOOLNIK, G.K.; DUBNAU, E.; GOMEZ, M.; SMITH, I. Role of the extracytoplasmic-function σ Factor σ^H in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. Mol. Microbiol., v. 2, p. 365-374, 2002.

MANGANELLI, R.; PROVVEDI, R.; RODRIGUE, S.; BEAUCHER, J.; GAUDREAU, L.; SMITH, I. Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol., v. 186, p. 895-902, 2004.

McGANN, P.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. The Alternative Sigma Factor σ^B and the Virulence Gene Regulator PrfA Both Regulate Transcription of *Listeria monocytogenes* Internalins. Appl. Env. Microbiol., v. 73, p. 2919-2930, 2007.

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. Microbiol. v. 153, p. 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. v.158, p. 279-286, 2007b.

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

MENZIES, P.I.; HWANG, T.-I.; PRESCOTT, J.F. Comparison of an interferon-gamma to a phospholipase D enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in experimentally infected goats. Vet. Microbiol., v. 100, p.129-137, 2004.

MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. The Genus *Corynebacterium*. In: MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. Veterinary Bacteriology and Virology. Iowa: The Iowa State University Press, 1967. p. 425–440.

MILLS, A.E.; MITCHELL, R.D.; LIM, E.K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. Pathology, v. 29, p. 231–233, 1997.

MISSIAKAS, D.; RAINA, S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. Mol. Microbiol., v. 28, p. 1059-1066, 1998.

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

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol. Microbiol., v. 26, p. 1005–1011, 1997.

MOORE, R.J.; ROTHEL, L.; KRYWULT, A.J.; LUND, K.L.; HODGSON, A.L.M. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. Vaccine, v. 18, p. 487-497, 2000.

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

NAIN, S.P.S.; GARG, D.N.; CHANDIRAMANI, N.K. An agar-gel-immunoprecipitation test for the detection of *Corynebacterium ovis* antibodies in sheep and goats sera. Indian. J. Comp. Microbiol. Infect. Dis., v.5, p. 93-96, 1984.

NAKUNST, D.; LARISCH, C.; HÜSER, A.T.; TAUCH, A.; PÜHLER, 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., v. 189, p. 4696-707, 2007.

NESVERA, J.; PÁTEK, 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.

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

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

PAGET, M.S.B.; HELMANN, J.D. The σ^{70} family of sigma factors. *Genome Biology*. v. 4, p.203.1-203.6. 2003.

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

PATON, M.W.; WALKER, S.B.; ROSE, I.R.; WATT, G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.*, v. 81, p. 91-95, 2003.

PAULE, B.J.A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L.F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C.R.; VALE, V.L.C.; MOURA-COSTA, L.F.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 96, p. 129-139, 2003.

PAULE, B.J.A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L.F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C.R.; VALE, V.L.C.; MOURA-COSTA, L.F.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; GOES, A.M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 96, p. 129-139, 2003.

PAULE, B.J.A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L.F.; BAHIA, C.R.; CARMINATI, R.; REGIS, L.F.; VALE, V.L.C.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr. Purif.*, v.34, p. 311-166, 2004.

PEEL, M.M.; PALMER, G.G.; STACPOOLE, A.M.; KERR, T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.*, v. 24, p. 185-191, 1997.

PEPIN, M.; PITTET, J.C.; OLIVER, M.; GOHIN, I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *J. Leukoc. Biol.*, v. 56, p. 666-670, 1994.

PEPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; ROTHEL, J.S.; HODGSON, A.L.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet Res.*, v. 28, p. 149-163, 1997.

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

POTVIN, E.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R.C. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.*, v. 32, p. 38-55, 2008.

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

PUECH, V.; CHAMI, M.; LEMASSU, A.; LANÉELLE, M.-A.; SCHIFFLER, B.; GOUNON, P.; BAYAN, N.; BENZ, R.; DAFFÉ, M. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology.*, v. 147, p. 1365–1382, 2001.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby Inc., 1994. p. 137-143.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C. Gênero *Corynebacterium*. In: QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 67-70.

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

RAIVIO, T.L.; SILHAVY, T.J. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 591-624, 2001.

RAJVANSHI, M.; VENKATESH, K.V. Phenotypic characterization of *Corynebacterium glutamicum* under osmotic stress conditions using elementary mode analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2010.

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.*, v. 68, p. 23-28, 2001.

RIEGEL, P.; RUIMY, R.; DE BRIEL, D.; PRÉVOST, G.; JEHL, F.; CHRISTEN, R.; MONTEIL, H. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 126, p. 271–276, 1995.

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.*, v. 219, p. 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.

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

- SCHUMANN, W. Thermosensors in eubacteria: role and evolution. *J. Biosci.* v. 32, p. 549-557, 2007.
- SCOTT, P.R. The Skin. In: SCOTT, P.R. *Sheep Medicine*. London: Mason Pub, 2007. p. 246-248.
- SELIM, A.S. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, v. 48, p. 241–258, 2001.
- SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G.; PORTELA, R.W.; BASTOS, B.L.; DORELLA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; GOUVEIA, A.M.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted protein-based ELISA. *Res. Vet. Sci.* v. 88, p. 50-55, 2010.
- SHIGIDI, M.T.A. An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Res. Vet. Sci.*, v. 24, p. 57-60, 1978.
- SHIGIDI, M.T.A. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Brit. Vet. J.*, v. 135, p 172-177, 1979.
- SIMMONS, C.P.; HODGSON, A.L.; STRUGNELL, R.A. Attenuation and vaccine potential of aroQ mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immune.*, v. 65, p. 3048-3065, 1997.
- SIMMONS, C.P.; DUNSTAN, S.J.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; HODGSON, A.L.; STRUGNELL, R.A. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 474-479, 1998.
- SONGER, J.G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M.M.; OLSON, G.B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 223–226, 1988.
- SONGER, J.G.; LIBBY, S.J.; IANDOLO, J.J.; CUEVAS, W.A. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v. 58, p. 131-136, 1990.
- SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.*, v. 5, p. 156–160, 1997.
- SONGER, J.G. The Genus *Corynebacterium*. In: SONGER, J.G. *Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease*. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. p. 72-80.
- STANDFORD, K.; BROGDEN, K.A.; MC CLELLAND, L.A.; KOZUB, G.C.; AUDIBERT, F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 38–43, 1998.

STARÓN, 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.

SUN, R.; CONVERSE, P.J.; KO, C.; TYAGI, S.; MORRISON, N.E.; BISHAI, W.R. *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor *sigC* is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Mol. Microbiol.*, v. 52, p. 25-38, 2004.

TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; MOORE, R.J.; HODGSON, A.L.M. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine*, v. 13, p. 1785-1792, 1995.

TAKAHASHI, T.; MORI, Y.; KOBAYASHI, H.; OCHI, M.; KIKUCHI, N.; HIRAMUNE, T. Phylogenetic positions and assignments of swine and ovine corynebacteria isolated based on the 16S rDNA sequence. *Microbiol. Immunol.*, v. 41, p. 649-655, 1997.

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

TER, LAAK E.A.; BOSCH, J.; BIJL, G.C.; SCHREUDER, B.E. Double-antibody sandwich enzymelinked immunosorbent assay and immunoblot analysis used for control of caseous lymphadenitis in goats and sheep. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, p. 1125-1132, 1992.

TESTERMAN, T.L.; VAZQUEZ-TORRES, A.; XU, Y.; JONES-CARSON, J.; LIBBY, S.J.; FANG, F.C. The alternative sigma factor sigma E controls antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol. Microbiol.*, v. 43, p. 771-782, 2002.

WALKER, J.; JACKSON, H.J., EGGLETON, D.G.; MEEUSEN, E.N.T.; WILSON, M.J.; BRANDON, M.R. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 2562-2567, 1994.

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

WILSON, M. J.; BRANDON, M.R. AND WALKER, J. Molecular and Biochemical Characterization of a Protective 40-Kilodalton Antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, v. 63, p. 206-211, 1995.

WOOD, L.F.; OHMAN, D.E. Use of cell wall stress to characterize sigma 22 (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, v. 72, p. 183-201, 2009.

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N.Y.; CHIZOV-GINBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies *Vet. Q.*, v. 18, p. 87-89, 1996.

YERUHAM, I.; FRIEDMAN S.; PERL S.; ELAD, D.; BERKOVICH, Y.; KALGARD, Y. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd. *Vet. Dermatol.*, v. 15, p. 315–320, 2004.

YUKAWA, H.; OMUMASABA, C.A.; NONAKA, H.; KÓŠ, P.; OKAI, N.; SUZUKI, N.; SUDA, M.; TSUGE, Y.; WATANABE, J.; IKEDA, Y.; VERTÈS, A.A.; INUI, M. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology*, v. 153, p. 1042-1058, 2007.

ZAKI, M.M. The application of a new technique for diagnosing *Corynebacterium ovis* infection. *Res. Vet. Sci.*, v.9, p. 489-493, 1968.

8. ANEXOS

Tabela 8.1 – Iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos internos dos genes que codificam os fatores *sigma* B, D, H, K e M de *C. pseudotuberculosis*

Iniciador	Seqüência
sigB_F	5'-GAAAAATTTGATTATTCCAAGG-3'
sigB_R	5'-GTCTAAGCCATAACGCATTC-3'
sigD_F	5'-GCCGAAACAGAGACTGAACTC-3'
sigD_R	5'-TCCTGCTCTAATGCCTTGC-3'
sigH_F	5'-TGCAAGAGACCTACATCAAGG-3'
sigH_R	5'-GTTTCAGAACTGTGAGAAGCC-3'
sigK_F	5'-CTTTCCGTTGTAGAGTTACCGGTC-3'
sigK_R	5'-TAATCCATCTCTGACCCAGG-3'
sigM_F	5'-CGACTCTGATCTCGTTCTACAG-3'
sigM_R	5'-CGGTCTGAACTTTTTCTATCTG-3'

Tabela 8.2 – Condições utilizadas para a amplificação dos fragmentos internos dos genes que codificam fatores *sigma* B, D, H, K e M de *C. pseudotuberculosis*

Etapa	Condição
Desnaturação inicial	3 min a 95°C
Desnaturação	1 min a 95°C
Extensão	1 min a 72°C
Anelamento	1 min a 57°C (<i>sigB</i>) 62°C (<i>sigD</i>) 63°C (<i>sigH</i>) 62°C (<i>sigK</i>) 64°C (<i>sigM</i>)
Número de ciclos	30 ciclos
Extensão final	7 min a 72°C

Tabela 8.3 - Iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação nas linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para os fatores *sigma* B, D, H, K e M

Iniciador	Seqüência
sigB_F	5'-ATGATGACAGAATCATCCAG-3'
sigB_R	5'-TTAGATCGCGTAGGCGCG-3'
sigBe_F	5'-ATGATGACAGAATCATCCAG-3'
sigBe_R	5'-TTAGATCGCGTAGGCGCG-3'
sigD_F	5'-ATGCGAATGATGGAAGAGAAA-3'
sigD_R	5'-TTAGTTCTCCTGCTCTAATG-3'
sigDe_F	5'-ATGCGAATGATGGAAGAGAAA-3'
sigDe_R	5'-TTAGTTCTCCTGCTCTAATG-3'
sigH_F	5'-ATGGCAACGAAAACAACTGA-3'
sigH_R	5'-TTATGCCTTCGCCTTTCCAA-3'
sigHe_F	5'-ATGGCAACGAAAACAACTGA-3'
sigHe_R	5'-TTATGCCTTCGCCTTTCCAA-3'
sigK_F	5'-ATGATTTCCACCCTTTCCGT-3'
sigK_R	5'-TTACACATCTACTACGGCAA-3'
sigKe_F	5'-ATGATTTCCACCCTTTCCGT-3'
sigKe_R	5'-TTACACATCTACTACGGCAA-3'
sigM_F	5'-ATGTCGCTACAAAACGACAC-3'
sigM_R	5'-CTAAAGCTCTTCGAATACGG-3'
sigMe_F	5'-ATGTCGCTACAAAACGACAC-3'
sigMe_R	5'-CTAAAGCTCTTCGAATACGG-3'
Kan_F	5'-ATGATTGAACAAGATGGATTG-3'
Kan_R	5'-TTAATAATTCAGAAGAACTC-3'
pTOPO [®] 2.1 M13_F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
pTOPO [®] 2.1 M13_R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tabela 8.4 - Combinações dos diferentes iniciadores utilizados para confirmar o evento de recombinação nas linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para os fatores *sigma* B, D, H, K e M e tamanho esperado dos fragmentos nas reações de PCR

Combinação de iniciadores	Tamanho esperado do fragmento na reação de PCR
Kan_F – Kan_R	794 pb
Kan_F – sigB_F	3326 pb
Kan_F – sigD_R	3426 pb
Kan_F – sigH_R	3377 pb
Kan_F – sigK_R	3403 pb
Kan_F – sigM_R	3344 pb
pTOPO®2.1 M13_F – sigB_R	562 pb
pTOPO®2.1 M13_F – sigD_F	662 pb
pTOPO®2.1 M13_F – sigH_F	613 pb
pTOPO®2.1 M13_F – sigK_F	639 pb
pTOPO®2.1 M13_F – sigM_F	580 pb
pTOPO®2.1 M13_R – sigB_R	540 pb
pTOPO®2.1 M13_R – sigD_R	640 pb
pTOPO®2.1 M13_R – sigH_R	591 pb
pTOPO®2.1 M13_R – sigK_R	617 pb
pTOPO®2.1 M13_R – sigM_R	558 pb
sigBe_F – sigBe_R	5345 pb
sigDe_F – sigDe_R	5042 pb
sigHe_F – sigHe_R	5074 pb
sigKe_F – sigKe_R	5658 pb
sigMe_F – sigMe_R	5038 pb

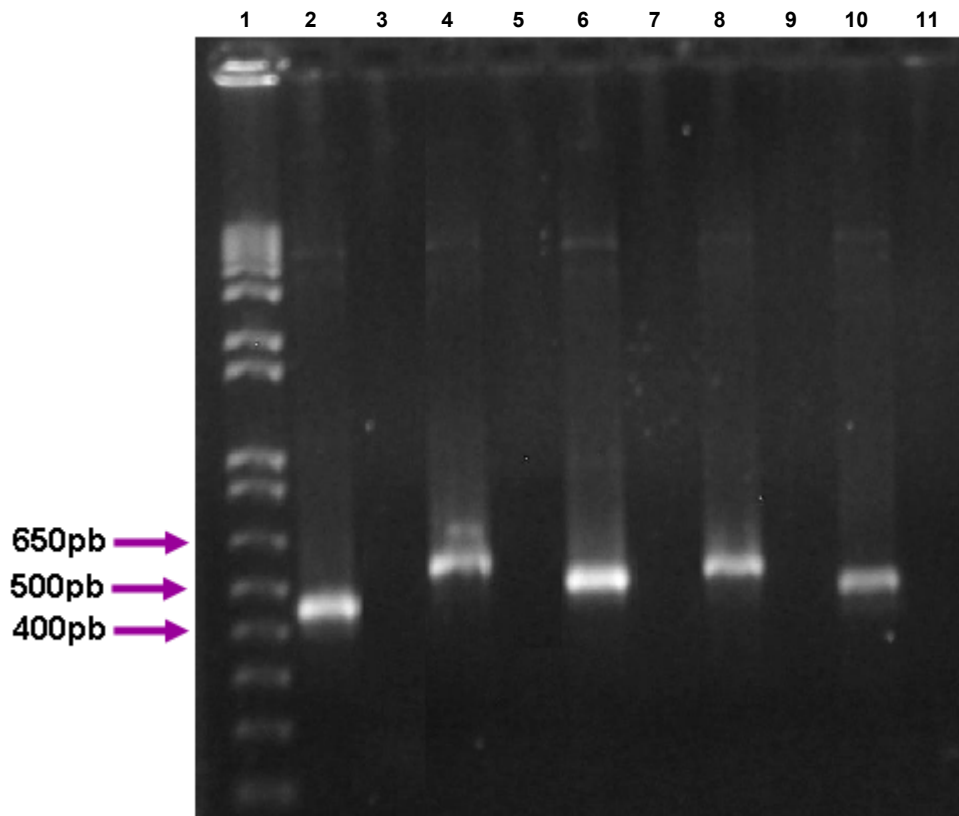


Figura 8.1 – Confirmação da presença dos fragmentos dos genes que codificam os fatores *sigma* B, D, H, K e M no pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) através de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]) (canaleta 1), fragmentos dos genes dos fatores *sigma* B, D, H, K e M amplificados por PCR (canaletas 2, 4, 6, 8, e 10, respectivamente), controle negativo dos fatores *sigma* B, D, H, K e M (canaletas 3, 5, 7, 9 e 11, respectivamente). Os fragmentos dos genes dos fatores *sigma* B, D, H, K e M possuem 451 pb, 551 pb, 502 pb, 528 pb e 469 pb, respectivamente.

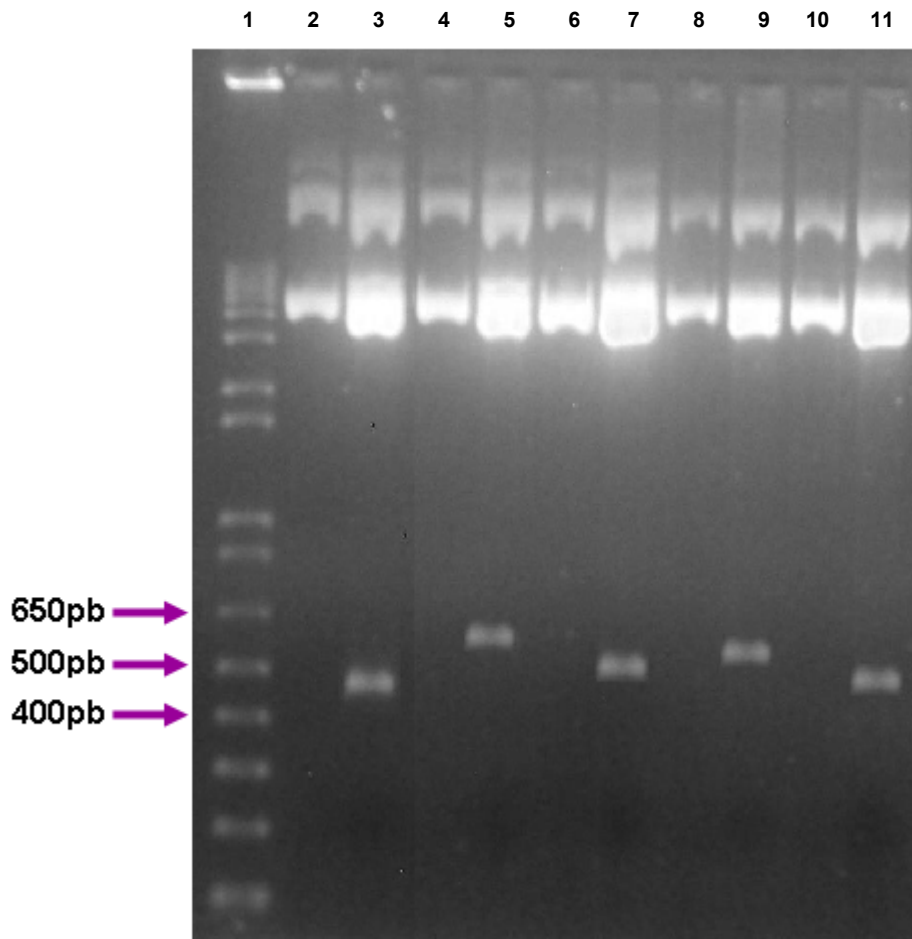


Figura 8.2 – Confirmação da presença dos fragmentos dos genes que codificam os fatores *sigma* B, D, H, K e M no pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) através de digestão com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen[®]). Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]) (canaleta 1), plasmídeos contendo os fragmentos dos genes dos fatores *sigma* B, D, H, K e M não digeridos (canaletas 2, 4, 6, 8, e 10, respectivamente), plasmídeos contendo os fragmentos dos genes dos fatores *sigma* B, D, H, K, e M digeridos (canaletas 3, 5, 7, 9 e 11, respectivamente). Os fragmentos dos genes dos fatores *sigma* B, D, H, K e M possuem 451 pb, 551 pb, 502 pb, 528 pb e 469 pb, respectivamente.

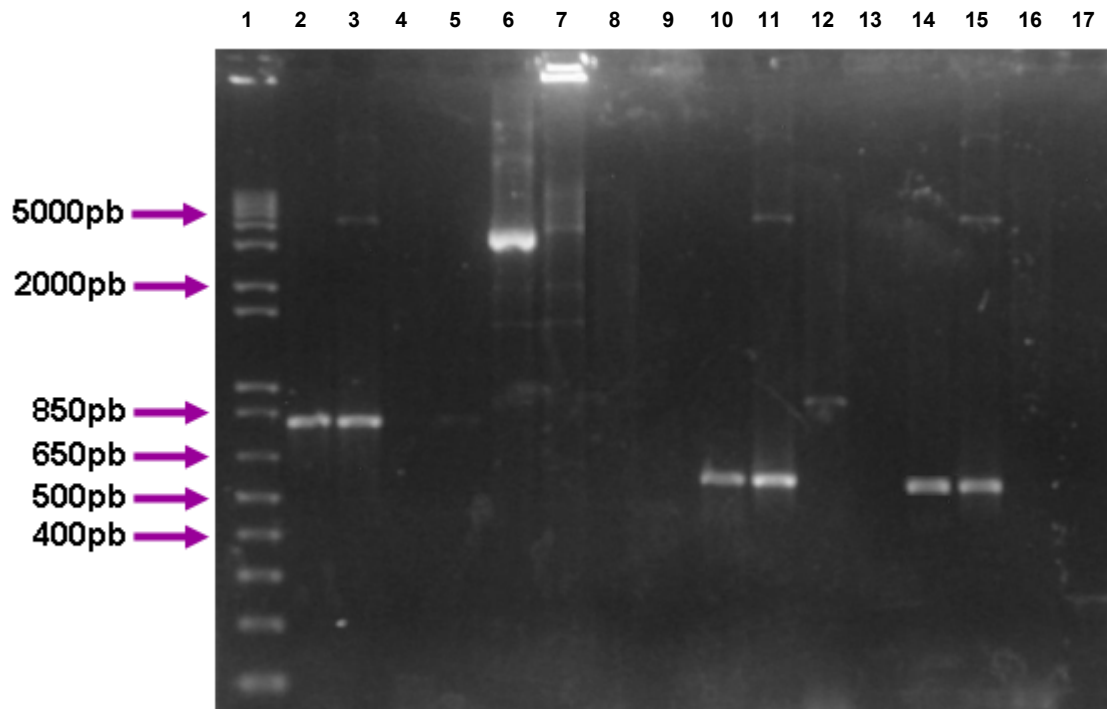


Figura 8.3 – Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* B através de ensaios de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) (canaleta 1); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – Kan_R, o que gera um fragmento de 794 pb (canaleta 2 – linhagem mutante para o fator *sigma* B, canaleta 3 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* B, canaleta 4 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 5 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – sigB_F, o que gera um fragmento de 3326 pb (canaleta 6 - linhagem mutante para o fator *sigma* B, canaleta 7 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* B, canaleta 8 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 9 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores pTOPO®2.1 M13_F – sigB_R, o que gera um fragmento de 562 pb (canaleta 10 - linhagem mutante para o fator *sigma* B, canaleta 11 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* B, canaleta 12 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 13 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação de iniciadores pTOPO®2.1 M13_R – sigB_F, o que gera um fragmento de 540 pb (canaleta 14 - linhagem mutante para o fator *sigma* B, canaleta 15 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* B, canaleta 16 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 17 – controle negativo).

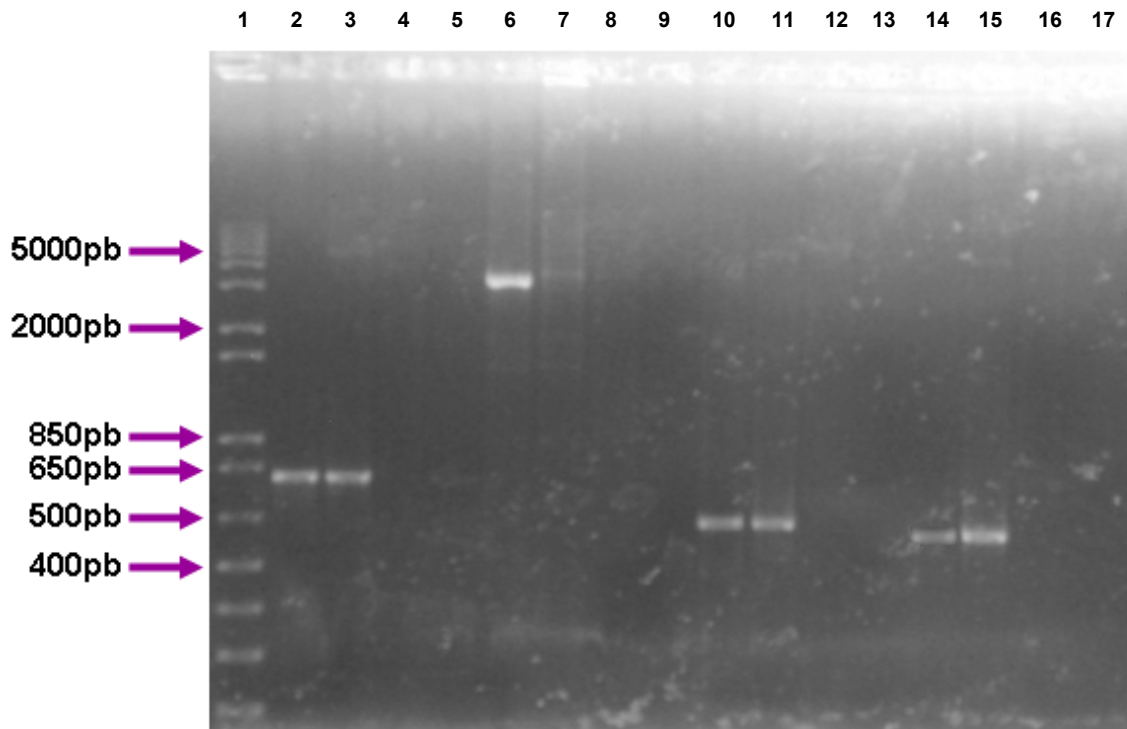


Figura 8.4 – Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* D através de ensaios de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) (canaleta 1); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – Kan_R, o que gera um fragmento de 794 pb (canaleta 2 – linhagem mutante para o fator *sigma* D, canaleta 3 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* D, canaleta 4 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 5 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – sigD_R, o que gera um fragmento de 3426 pb (canaleta 6 - linhagem mutante para o fator *sigma* D, canaleta 7 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* D, canaleta 8 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 9 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores pTOPO®2.1 M13_F – sigD_F, o que gera um fragmento de 662 pb (canaleta 10 - linhagem mutante para o fator *sigma* D, canaleta 11 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* D, canaleta 12 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 13 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação de iniciadores pTOPO®2.1 M13_R – sigD_R, o que gera um fragmento de 640 pb (canaleta 14 - linhagem mutante para o fator *sigma* D, canaleta 15 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* D, canaleta 16 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 17 – controle negativo).

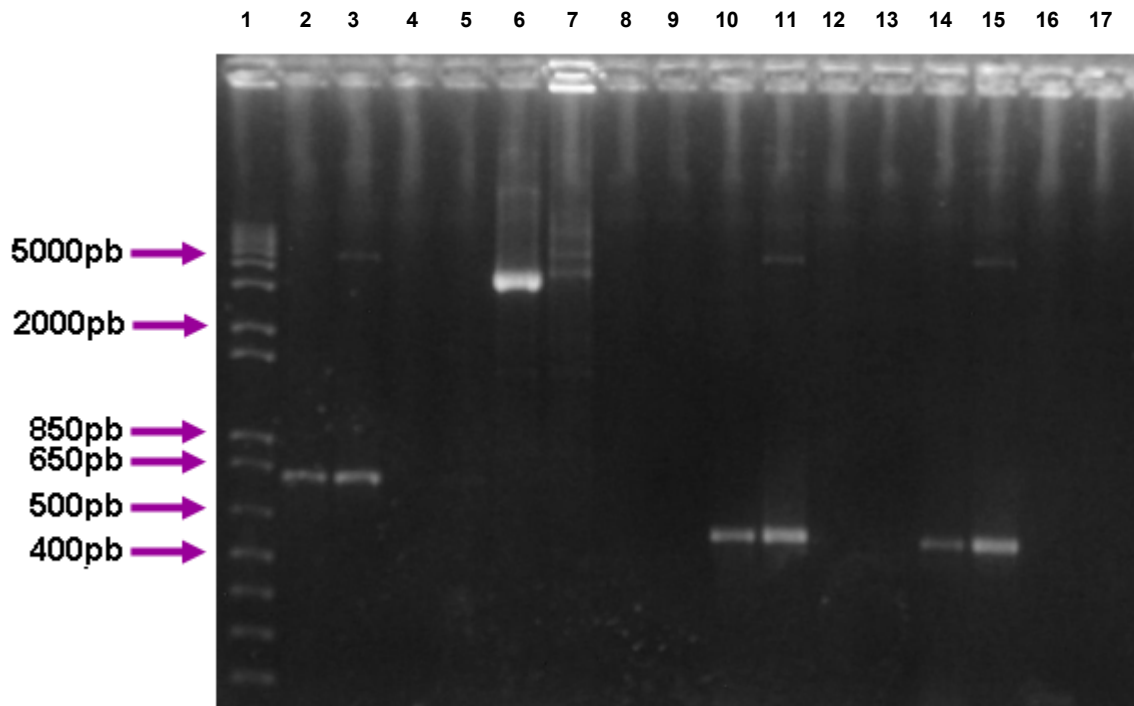


Figura 8.5 – Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* H através de ensaios de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[®]) (canaleta 1); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – Kan_R, o que gera um fragmento de 794 pb (canaleta 2 – linhagem mutante para o fator *sigma* H, canaleta 3 – plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* H, canaleta 4 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 5 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – sigH_R, o que gera um fragmento de 3377 pb (canaleta 6 - linhagem mutante para o fator *sigma* H canaleta 7 – plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* H, canaleta 8 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 9 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores pTOPO[®]2.1 M13_F – sigH_F, o que gera um fragmento de 613 pb (canaleta 10 - linhagem mutante para o fator *sigma* H, canaleta 11 – plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* H, canaleta 12 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 13 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação de iniciadores pTOPO[®]2.1 M13_R – sigH_R, o que gera um fragmento de 591 pb (canaleta 14 - linhagem mutante para o fator *sigma* H, canaleta 15 – plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* H, canaleta 16 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 17 – controle negativo).

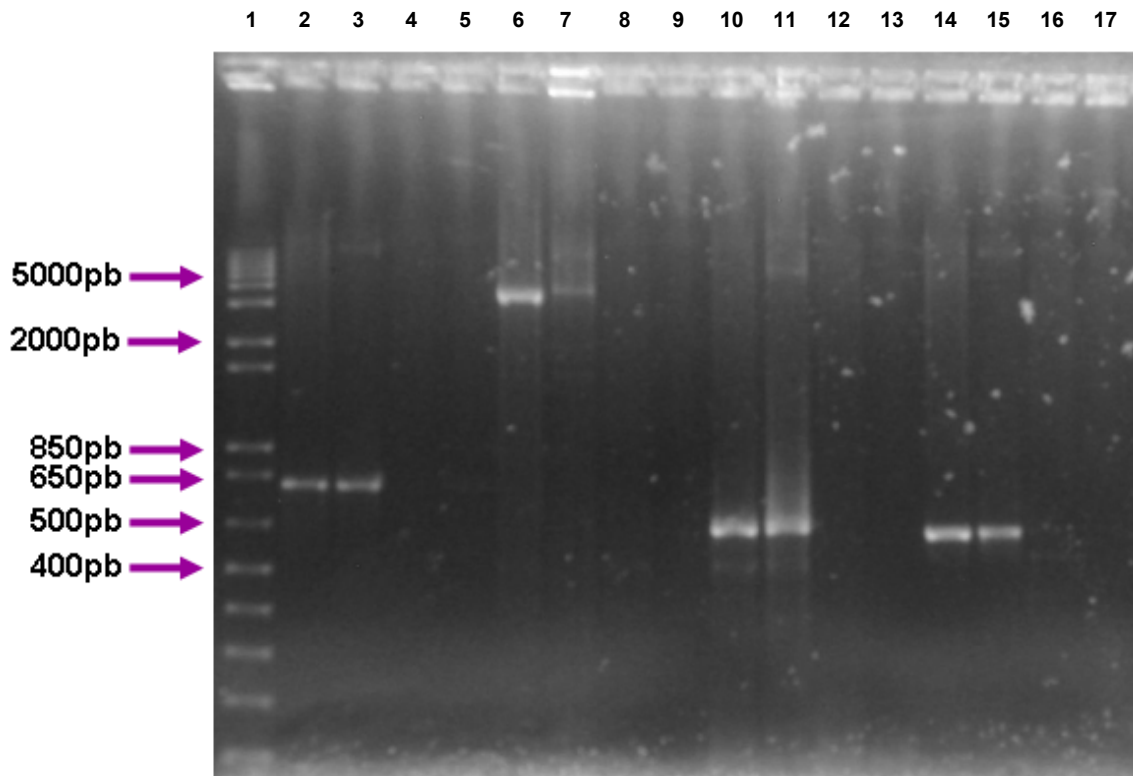


Figura 8.6 – Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma* K através de ensaios de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) (canaleta 1); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – Kan_R, o que gera um fragmento de 794 pb (canaleta 2 – linhagem mutante para o fator *sigma* K, canaleta 3 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* K, canaleta 4 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 5 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – sigK_R, o que gera um fragmento de 3403 pb (canaleta 6 - linhagem mutante para o fator *sigma* K, canaleta 7 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* K, canaleta 8 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 9 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores pTOPO®2.1 M13_F – sigK_F, o que gera um fragmento de 639 pb (canaleta 10 - linhagem mutante para o fator *sigma* K, canaleta 11 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* K, canaleta 12 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 13 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação de iniciadores pTOPO®2.1 M13_R – sigK_R, o que gera um fragmento de 617 pb (canaleta 14 - linhagem mutante para o fator *sigma* K, canaleta 15 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma* K, canaleta 16 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 17 – controle negativo).

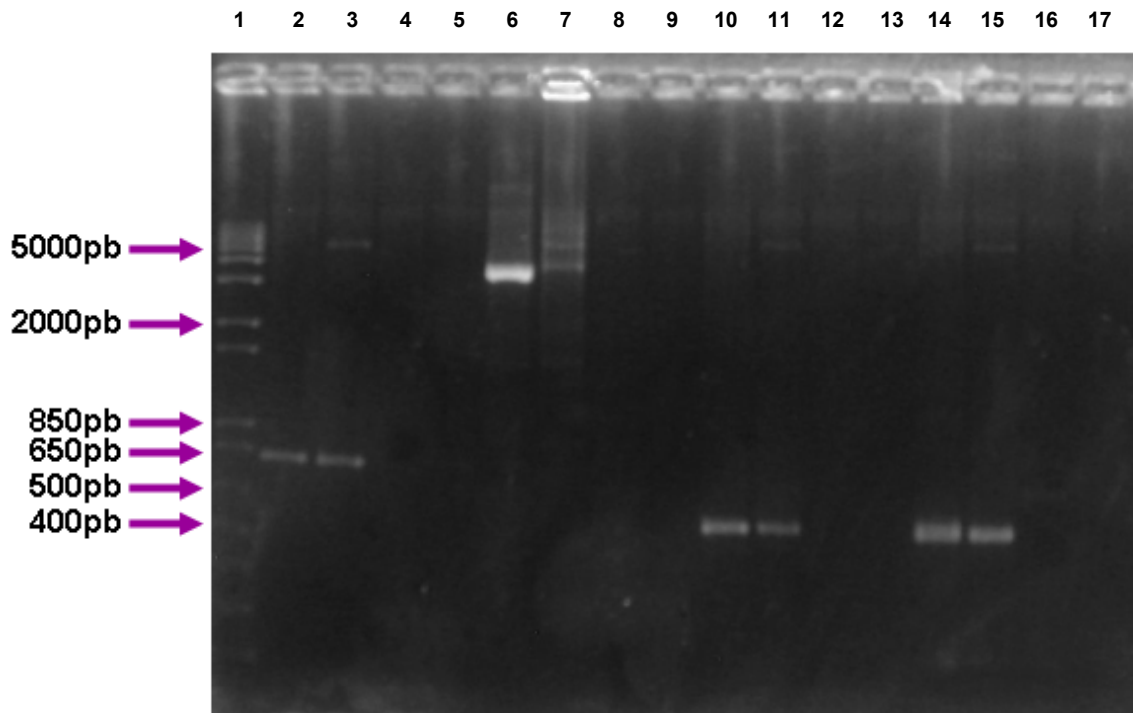


Figura 8.7 – Confirmação do evento de recombinação na linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o fator *sigma M* através de ensaios de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) (canaleta 1); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – Kan_R, o que gera um fragmento de 794 pb (canaleta 2 – linhagem mutante para o fator *sigma M*, canaleta 3 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma M*, canaleta 4 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 5 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores Kan_F – sigM_R, o que gera um fragmento de 3344 pb (canaleta 6 - linhagem mutante para o fator *sigma M*, canaleta 7 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma M*, canaleta 8 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 9 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores pTOPO®2.1 M13_F – sigM_F, o que gera um fragmento de 580 pb (canaleta 10 - linhagem mutante para o fator *sigma M*, canaleta 11 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma M*, canaleta 12 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 13 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação de iniciadores pTOPO®2.1 M13_R – sigM_R, o que gera um fragmento de 558 pb (canaleta 14 - linhagem mutante para o fator *sigma M*, canaleta 15 – plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) contendo o fragmento do gene do fator *sigma M*, canaleta 16 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 17 – controle negativo).

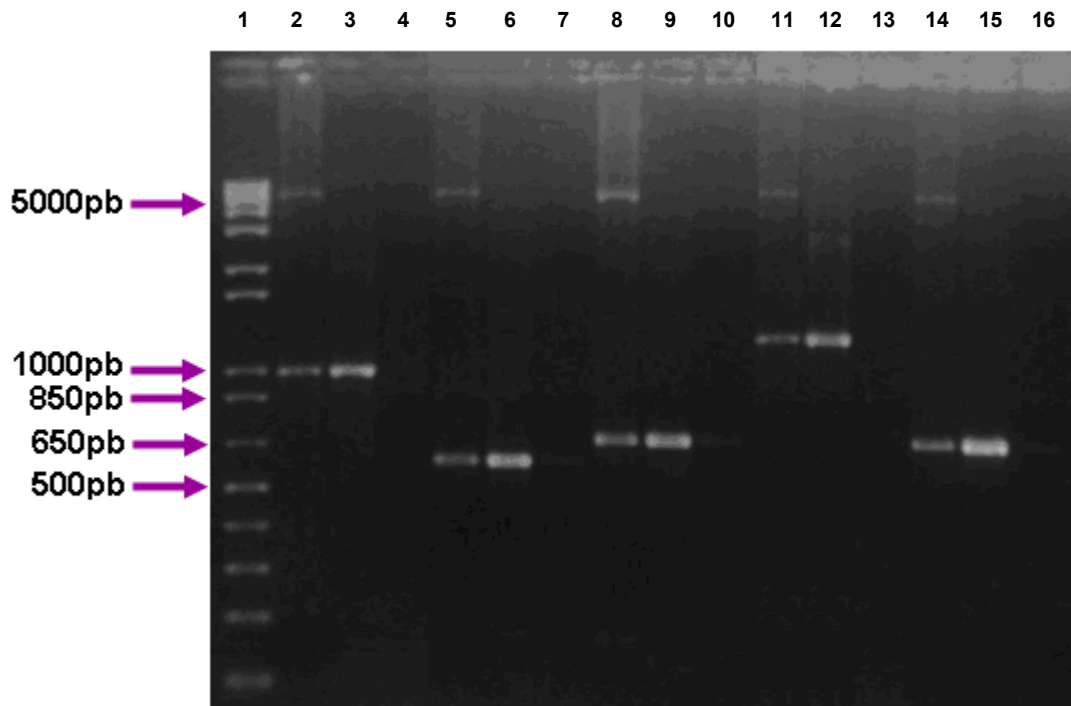


Figura 8.8 – Confirmação do evento de recombinação nas linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para os fatores *sigma* B, D, H, K e M através de um ensaio de PCR. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) (canaleta 1); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores sigBe_F – sigBe_R, o que gera um fragmento de 5345 pb a partir do DNA genômico da linhagem mutante para o fator *sigma* B e um fragmento de 994 pb a partir do DNA genômico da linhagem 1002 selvagem (canaleta 2 – linhagem mutante para o fator *sigma* B, canaleta 3 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 4 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores sigDe_F – sigDe_R, o que gera um fragmento de 5042 pb a partir do DNA genômico da linhagem mutante para o fator *sigma* D e um fragmento de 591 pb a partir do DNA genômico da linhagem 1002 selvagem (canaleta 5 – linhagem mutante para o fator *sigma* D, canaleta 6 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 7 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores sigHe_F – sigHe_R, o que gera um fragmento de 5074 pb a partir do DNA genômico da linhagem mutante para o fator *sigma* H e um fragmento de 672 pb a partir do DNA genômico da linhagem 1002 selvagem (canaleta 8 – linhagem mutante para o fator *sigma* H, canaleta 9 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 10 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores sigKe_F – sigKe_R, o que gera um fragmento de 5658 pb a partir do DNA genômico da linhagem mutante para o fator *sigma* K e um fragmento de 1230 pb a partir do DNA genômico da linhagem 1002 selvagem (canaleta 11 – linhagem mutante para o fator *sigma* K, canaleta 12 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 13 – controle negativo); ensaio de PCR utilizando a combinação dos iniciadores sigMe_F – sigMe_R, o que gera um

fragmento de 5038 pb a partir do DNA genômico da linhagem mutante para o fator *sigma* M e um fragmento de 669 pb a partir do DNA genômico da linhagem 1002 selvagem (canaleta 14 – linhagem mutante para o fator *sigma* M, canaleta 15 – linhagem 1002 selvagem, canaleta 16 – controle negativo);

Caroline Pereira Domingueti

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Caroline Pereira Domingueti

Nome em citações bibliográficas DOMINGUETI, C P

Sexo feminino

Filiação Helder Ponciano Domingueti e Rozilene Fávoro Pereira Domingueti

Nascimento 10/12/1984 - Varginha/MG - Brasil

Carteira de Identidade MG13553760 ssp - MG - 27/07/2001

CPF 07733327660

Endereço residencial Rua, Mato Grosso, 666, apto 908, bloco 2
Barro Preto - Belo Horizonte
30190-080, MG - Brasil
Telefone: 31 37860620

Endereço profissional Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627
Pampulha - Belo Horizonte
31270-901, MG - Brasil
URL da home page: <http://www.ufmg.br>

Endereço eletrônico

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

e-mail alternativo : caroline@vbconnect.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2009** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: Análise do papel do fator *sigma C* na resposta de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse ambiental.
Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Palavras-chave: Corynebacterium pseudotuberculosis, fator sigma C, linhagem mutante, resposta a estresse, virulência
Áreas do conhecimento: Genética Molecular, de Microorganismos e Biotecnologia
- 2007 - 2008** Graduação em Bioquímica em Análises Clínicas e Toxicológicas.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- 2004 - 2007** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Vínculo institucional

2009 - Atual	Vínculo: Mestrado , Enquadramento funcional: Pesquisador , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
2005 - 2007	Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Pesquisador , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

2009 - Atual	Projetos de pesquisa, Instituto de Ciências Biológicas <i>Participação em projetos:</i> <i>Análise do papel do fator sigma C na resposta de Corynebacterium pseudotuberculosis a diferentes condições de estresse ambiental.</i>
2006 - 2007	Projetos de pesquisa, Faculdade de Farmácia <i>Participação em projetos:</i> <i>Eventos Trombóticos Arteriais: Avaliação de Polimorfismos no Gene da Apolipoproteína E em Pacientes Atendidos em Serviço Médico Especializado em Hemostasia</i>
2005 - 2006	Projetos de pesquisa, Faculdade de Farmácia <i>Participação em projetos:</i> <i>Avaliação de Fatores Genéticos Predisponentes a Trombose Venosa em Pacientes do Estado de Minas Gerais</i>

2. Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da UFMG - HC-UFMG

Vínculo institucional

2008 - 2008	Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 30, Regime: Parcial
--------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------

Projetos

2009 - Atual Análise do papel do fator *sigma C* na resposta de *Corynebacterium pseudotuberculosis* a diferentes condições de estresse ambiental.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);

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

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG

2006 - 2007 Eventos Trombóticos Arteriais: Avaliação de Polimorfismos no Gene da Apolipoproteína E em Pacientes Atendidos em Serviço Médico Especializado em Hemostasia

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);

Integrantes: Caroline Pereira Domingueti; Lucy; Ana Paula Salles Moura Fernandes (Responsável); Adriano de Paula Sabino; Maria das Graças Carvalho; Daniel Ribeiro

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2005 - 2006 Avaliação de Fatores Genéticos Predisponentes a Trombose Venosa em Pacientes do Estado de Minas Gerais

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);

Integrantes: Caroline Pereira Domingueti; Ana Paula Salles Moura Fernandes (Responsável); Adriano de Paula Sabino; Maria das Graças Carvalho; Daniel Ribeiro; Luci Maria Sant'Ana Dusse

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Áreas de atuação

1. Genética Molecular e de Microorganismos
2. Biologia Molecular
3. Farmácia
4. Análises Clínicas e Toxicológicas

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Francês Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve
Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Prêmios e títulos

2007 Medalha de Mérito Acadêmico devido ao excelente desempenho acadêmico no Curso de Farmácia, com obtenção de rendimento semestral global de 4,86, Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ROCHA, F S, DORELLA, F A, DOMINGUETI, C P, MIYOSHI, A, AZEVEDO, V
Avaliação da Capacidade Protetora de uma Linhagem Mutante de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como Promissora Vacina no Combate à Linfadenite Caseosa em Caprinos. In: 56 Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá.

56 Congresso Brasileiro de Genética. , 2010.

Áreas do conhecimento : Genética Molecular, de Microorganismos e Biotecnologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

2. DOMINGUETI, C P, PACHECO, L. G., CASTRO, TLP, SOUZA, BM, MIYOSHI, A, AZEVEDO, V

Construção de uma linhagem mutante para o fator *sigma C (sigC)* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para avaliar a contribuição deste na resposta a diferentes condições de estresse e na virulência desta bactéria. In: 27 Reunião de Genética de Microrganismos, 2010, Guarujá.

27 Reunião de Genética de Microrganismos. , 2010.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, fatores *sigma*, linhagem mutante, resposta a estresse, virulência
Áreas do conhecimento : Genética Molecular, de Microorganismos e Biotecnologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

3. DOMINGUETI, C P, PACHECO, L. G., CASTRO, TLP, SOUZA, BM, MIYOSHI, A, AZEVEDO, V

Construção de uma linhagem mutante para o fator *sigma C (sigC)* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para avaliar a contribuição deste na resposta a diferentes condições de estresse e na virulência desta bactéria. In: 56 Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá.

56 Congresso Brasileiro de Genética. , 2010.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, fatores *sigma*, linhagem mutante, resposta a estresse, virulência
Áreas do conhecimento : Genética Molecular, de Microorganismos e Biotecnologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. GADELHA, T, SABINO, A P, RIBEIRO, D, DOMINGUETI, C P, SANTOS, M S, CARVALHO, M G, FERNANDES, A P S M

Lack of association between plasminogen activator inhibitor -1 4G/5G gene promoter polymorphism and PAI-1 plasma levels in patients with ischemic stroke In: 15 th Congress of the European Hematology Association, 2010, Barcelona.

Official Organ of the European Hematology Association. Pavia: Ferrata-Storti Foundation, 2010. v.95. p.290 - 290

Áreas do conhecimento : Hematologia, Biologia Molecular
Referências adicionais : Espanha/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5. SABINO, A P, CARVALHO, M G, RIBEIRO, D, DOMINGUETI, C P, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M

P-S-036] FACTOR V LEIDEN (G1691A), PROTHROMBIN (G20210A) AND METILENETETRAHYDROFOLATE In: XXI st Congress of the Internacional Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva.

CD room. , 2007.

Referências adicionais : Suíça/Inglês. Meio de divulgação: Vários

6. SABINO, A P, CARVALHO, M G, RIBEIRO, D, DOMINGUETI, C P, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M

[P-S-353] PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR -1 (PAI-1) PLASMA LEVELS AND 4G/5G AND G844A PAI-1 PROMOTER POLYMORFISMS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH ISQUEMIC STROKE AND PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE In: XXI st Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva.

CD room. , 2007.

Referências adicionais : Suíça/Inglês. Meio de divulgação: Vários

7. SABINO, A P, CARVALHO, M G, RIBEIRO, D, DOMINGUETI, C P, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M
[P-W-441] APOB/APOA-I RATIO IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE (IS) AND PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE In: XXI st Congress of the Internacional Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva.
CD ROOM. , 2007.

Referências adicionais : Suíça/Inglês. Meio de divulgação: Vários

8. SABINO, A P, CARVALHO, M G, RIBEIRO, D, PAIVA, S G, DOMINGUETI, C P, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M
[P-W-442] PREVALENCE OF APOLIPOPROTEIN E ALLELES AND ITS ASSOCIATION WITH SERUM LIPID LEVELS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE AND PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE In: XXI st Congress of the Internacional Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva.
CD ROOM. , 2007.

Referências adicionais : Suíça/Inglês. Meio de divulgação: Vários

9. SABINO, A P, CARVALHO, M G, RIBEIRO, D, DOMINGUETI, C P, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M
[P-W-605] HOMOCYSTEINE PLASMA LEVELS AND MTHFR C677T MUTATION IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERIAL DISEASE, ISCHEMIC STROKE AND PERIPHERAL ARTERIAL OBSTRUCTIVE DISEASE In: XXI st Congress of the Internacional Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva.
cd room. , 2007.

Referências adicionais : Suíça/Inglês. Meio de divulgação: Vários

10. SABINO, A P, CARVALHO, M G, RIBEIRO, D, DOMINGUETI, C P, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M
Serum C-reactive protein plasma levels in patients with arterial thrombosis In: XXI st Congress of the Internacional Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva.
CD ROOM. , 2007.

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

11. SABINO, A P, CARVALHO, M G, DUSSE, L. M. S., RIBEIRO, D, DOMINGUETI, C P, FERNANDES, A P S M
Polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene do inibidor do ativador de plasminogênio 1 em pacientes jovens com trombose arterial In: 40 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, 2006, Curitiba.
pôster. , 2006.

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

12. SABINO, A P, CASTRO, TLP, DUSSE, L. M. S., RIBEIRO, D, DOMINGUETI, C P, FERNANDES, A P S M
Prevalência dos alelos E2, E3 e E4 do gene da apolipoproteína E em pacientes com eventos trombóticos arteriais In: 40 Congressr Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, 2006, Curitiba.
pôster. , 2006.

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

Apresentação de Trabalho

1. DOMINGUETI, C P, SABINO, A P, RIBEIRO, D, CARVALHO, M G, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M
Eventos Trombóticos Arteriais: Avaliação de Polimorfismos no Gene da Apolipoproteína E em Pacientes Atendidos em Serviço Médico Especializado em Hemostasia, 2007.
(Seminário, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Hematologia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: Universidade Federal de Minas Gerais; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XVI Semana de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Minas Gerais

2. DOMINGUETI, C P, SABINO, A P, RIBEIRO, D, CARVALHO, M G, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M

Avaliação de Polimorfismos no Gene da Apolipoproteína E em Pacientes Atendidos em Serviço Médico Especializado em Hemostasia, 2006. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Hematologia

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

3. DOMINGUETI, C P, SABINO, A P, RIBEIRO, D, CARVALHO, M G, DUSSE, L. M. S., FERNANDES, A P S M

Avaliação de Fatores Genéticos Predisponentes a Trombose Venosa em Pacientes do Estado de Minas Gerais, 2005. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Hematologia

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Universidade Federal de Minas Gerais; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XIV Semana de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Minas Gerais

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **27 Reunião de Genética de Microrganismos, 2010.** (Simpósio)

Construção de uma linhagem mutante para o fator sigma C (sigC) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para avaliar a contribuição deste na resposta a diferentes condições de estresse e na virulência desta bactéria.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **56 Congresso Brasileiro de Genética, 2010.** (Congresso)

Construção de uma linhagem mutante para o fator sigma C (sigC) de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para avaliar a contribuição deste na resposta a diferentes condições de estresse e na virulência desta bactéria.

3. **IV Meeting in Fundamental Aspects os DNA Repair and Mutagenesis, 2009.** (Encontro)

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

“Eventos Trombóticos Arteriais: Avaliação de Polimorfismos no Gene da Apolipoproteína E em Pacientes Atendidos em Serviço Médico Especializado em Hemostasia”.

5. **XXVIII Simpósio Acadêmico de Estudos Farmacêuticos - Curso de Micologia Clínica, 2007.** (Simpósio)

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Semana de Iniciação Científica, 2006.** (Seminário)

“Eventos Trombóticos Arteriais: Avaliação de Polimorfismos no Gene da Apolipoproteína E em Pacientes Atendidos em Serviço Médico Especializado em Hemostasia”.

7. **XXVII Simpósio Acadêmico de Estudos Farmacêuticos - Curso de Transtornos Menores, 2006.** (Simpósio)

8. **I Semana do Empreendedorismo Farmacêutico - Curso de Perícia Criminal – Ênfase em Toxicologia Forense, 2006.** (Simpósio)

9. **XXVII Simpósio Acadêmico de Estudos Farmacêuticos - Curso de Psicofarmacologia, 2006.** (Simpósio)

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Semana de Iniciação Científica, realizada na Universidade Federal de Minas Gerais**, 2005. (Seminário)
“Avaliação de Fatores Genéticos Predisponentes a Trombose Venosa em Pacientes do Estado de Minas Gerais”.

11. **XXV Simpósio Acadêmico de Estudos Farmacêuticos - Curso Farmacêutico Profissional da Saúde**, 2004. (Simpósio)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos.....	12
Apresentações de Trabalhos (Seminário).....	3

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	1
Participações em eventos (seminário).....	3
Participações em eventos (simpósio).....	6
Participações em eventos (encontro).....	1

Outras informações relevantes

- 1 Primeira colocada na classificação do Processo Seletivo do segundo semestre de 2009 para o Mestrado no Departamento de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais.
- 2 Primeira colocada na classificação do Concurso para o Curso de Adaptação de Médicos, Dentistas e Farmacêuticos da Aeronáutica de 2009 para o cargo de Farmacêutico-Bioquímico.
- 3 Primeira colocada na classificação do Concurso Vestibular de 2004 para o Curso de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.