

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



Dissertação de Mestrado

**Caracterização do internalizador de peptídeos
Opp em *Corynebacterium pseudotuberculosis*
e o estudo do seu papel na virulência e
patogenicidade dessa bactéria.**

Pablo Matias Ribeiro de Oliveira Moraes

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Azevedo

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

BELO HORIZONTE

Março – 2012

Pablo Matias R.O. Moraes

**Caracterização do internalizador de peptídeos
Opp em *Corynebacterium pseudotuberculosis*
e o estudo do seu papel na virulência e
patogenicidade dessa bactéria.**

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

Março – 2012

Dedico essa Dissertação ao meu pai, pelo apoio irrestrito e por ter me dado a principal oportunidade da minha vida, os estudos.

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 que me foi dada de entrar na equipe LGCM e pela orientação e crença no meu potencial;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Anderson Miyoshi, pelos ensinamentos, conselhos científicos, e por ser sempre atencioso quando solicitado;

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem este trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Genética Celular e Molecular pela amizade, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho e por contribuírem para o meu crescimento científico. Agradeço especialmente a Fê Dorella e ao Wanderson por terem me auxiliado na escrita da dissertação;

Ao meu pai pelo “paitrocínio” e o apoio total e incondicional durante toda essa caminhada. Muito obrigado;

As minhas irmãs Flavia e Melina que sempre estiveram presentes me aconselhando e me ajudando;

À minha namorada, Carol, pelo amor, pela companhia agradável, pela compreensão e por me confortar nas horas difíceis. Obrigado meu Amor;

Aos amigos, pela descontração, pelos conselhos e por tornar essa caminhada menos tortuosa. Minha segunda família.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

(Albert Einstein)

"Para pesquisar a verdade é preciso duvidar, quanto seja possível, de todas as coisas, uma vez na vida."

(René Descartes)

Sumário

| | |
|---|------|
| Lista de figuras | x |
| Lista de tabelas | xiii |
| Lista de abreviaturas | xiv |
| Resumo | 15 |
| Abstract | 16 |
| I. INTRODUÇÃO | 17 |
| I.1 Linfadenite caseosa | 17 |
| I.1.1 A doença..... | 17 |
| I.1.2 Impactos econômicos | 17 |
| I.1.3 Epidemiologia | 18 |
| I.1.4 Transmissão | 19 |
| I.1.5 Patogenia e imunologia..... | 20 |
| I.1.6 Tratamento | 21 |
| I.1.7 Profilaxia | 22 |
| I.1.7.1 Diagnóstico | 22 |
| I.1.7.2 Vacinas | 23 |
| I.2 O gênero <i>Corynebacterium</i> | 25 |
| I.3 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | 25 |
| I.3.1 Propriedades bioquímicas..... | 26 |
| I.3.2 Taxonomia | 26 |
| I.3.3 Projeto Genoma de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | 27 |
| I.3.4 Fatores de virulência..... | 28 |
| I.3.4.1 Fosfolipase D | 28 |
| I.3.4.2 Lipídeos tóxicos da parede celular | 29 |
| I.3.4.3 Novos candidatos..... | 29 |
| I.4 Internalizadores de peptídeos (Opp) bacterianos..... | 30 |
| II. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA REALIZAÇÃO DO PROJETO..... | 37 |
| III. OBJETIVOS | 38 |

| | |
|---|----|
| III.1 Objetivo Geral..... | 38 |
| III.2 Objetivos específicos; | 38 |
| IV. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| IV.1. Reagentes e kits de biologia molecular | 39 |
| IV.2. Soluções e meios de cultura..... | 40 |
| IV.3. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo..... | 42 |
| IV.4. Manipulação do DNA..... | 45 |
| IV.5. Resolução eletroforética | 45 |
| IV.6. Construção de uma linhagem de <i>C. pseudotuberculosis oppD</i> mutante. | 45 |
| IV.6.1. Transformação bacteriana | 46 |
| IV.6.1.1. Preparo de <i>C. pseudotuberculosis</i> eletrocompetente..... | 46 |
| IV.6.1.2. Transformação de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 47 |
| IV.7. Confirmação do mutante $\Delta oppD$ | 47 |
| IV.7.1. Extração do DNA genômico de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 47 |
| IV.7.2. Confirmação do evento de recombinação homóloga simples por PCRs | 48 |
| IV.8. Identificação e caracterização do operon <i>opp</i> em <i>C. pseudotuberculosis</i> | 50 |
| IV.8.1. Análise do operon <i>opp</i> no genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 50 |
| IV.8.2. Análise de similaridade | 50 |
| IV.8.3. Análise dos domínios protéicos | 50 |
| IV.8.4. Confirmação <i>in-silico</i> do operon..... | 50 |
| IV.9. Padronização de um teste fenotípico para confirmar a perda da função da linhagem mutante $\Delta oppD$ de <i>C. pseudotuberculosis</i> na internalização de peptídeos | 51 |
| IV.9.1. Curvas de crescimento das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> selvagem e mutante $\Delta oppD$ na presença do tripeptídeo tóxico glutathiona (GSH)..... | 51 |
| IV.10 Comparação do perfil de expressão de proteínas secretadas entre as linhas linhagens selvagem (wt) e mutante ($\Delta oppD$)..... | 52 |
| IV.10.1 Extração das proteínas extracelulares | 53 |
| IV.10.2 Eletroforese bidimensional (2-DE) | 53 |
| IV.10.3 Coloração por Coomassie coloidal | 53 |
| IV.10.4 Digitalização e análise das imagens | 54 |

| | |
|--|----|
| IV.11. Estudo do papel do transportador de peptídeos Opp na virulência e patogenicidade de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 54 |
| IV.11.1. Comparação da viabilidade, em macrófagos murinos J774, de <i>C. pseudotuberculosis</i> selvagem e mutante..... | 54 |
| IV.11.1.1. Preparação das monocamadas de células J774..... | 54 |
| IV.11.1.2. Ensaio da interação microbiana com células J774..... | 55 |
| IV.11.1.3. Ensaio de viabilidade intracelular..... | 55 |
| IV.11.1.4. Análises estatísticas..... | 56 |
| IV.11.2. Ensaio de infecção e persistência com as linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> selvagem e mutante $\Delta oppD$ | 56 |
| IV.11.2.1. Animais e parâmetros da infecção..... | 56 |
| IV.11.2.2. Infecção experimental dos camundongos e análises de virulência..... | 56 |
| V. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 58 |
| V.1 Avaliação da utilização de um clone da biblioteca genômica de <i>C. pseudotuberculosis</i> para geração da linhagem $\Delta oppD$ mutante..... | 58 |
| V.2 Confecção e confirmação da linhagem mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i> defectiva no transporte de peptídeos..... | 59 |
| V.3 Identificação e caracterização do operon opp de <i>C. pseudotuberculosis</i> através de análises <i>in silico</i> | 61 |
| V.3.1 Comparação das sequências nucleotídicas dos genes pertencentes ao operon opp entre as linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> já sequenciadas..... | 63 |
| V.3.2 Confirmação <i>in-silico</i> do operon..... | 64 |
| V.4 Padronização de um teste fenotípico para confirmar a perda da função da linhagem mutante $\Delta oppD$ de <i>C. pseudotuberculosis</i> na internalização de peptídeos..... | 65 |
| V.5 Comparação do perfil de proteínas secretadas entre as linhagens selvagem e mutante..... | 67 |
| V.6 Avaliação do papel do transportador de peptídeos Opp na virulência e patogenicidade de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 71 |
| V.6.1 Comparação da capacidade de infecção e adesão a macrófagos entre as linhagens mutante e selvagem..... | 71 |
| V.6.2 Infecção de camundongos BALB/c com as linhagens selvagem e mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 73 |

| | |
|--|----|
| VI. CONCLUSÕES | 77 |
| VII. PERSPECTIVAS..... | 78 |
| VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |
| IV. ANEXOS | 89 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação esquemática das proteínas do transportador de peptídeos em bactérias Gram-negativas e positivas. | 31 |
| Figura 2: Representação da estrutura gênica mais comum do operon <i>opp</i> . <i>oppA</i> , <i>oppB</i> , <i>oppC</i> , <i>oppD</i> , <i>oppF</i> | 31 |
| Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de ligação a peptídeos pela subunidade OppA..... | 32 |
| Figura 4: Representação esquemática do processo de comunicação celular envolvendo peptídeos sinalizadores e os transportadores Opp. | 34 |
| Figura 5: Representação esquemática do evento de recombinação homóloga simples entre o plasmídeo pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen [®]) contendo o fragmento da ORF <i>oppD</i> e o gene <i>oppD</i> presente no cromossomo de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 46 |
| Figura 6: Representação esquemática do procedimento utilizado para confecção das curvas de crescimento das linhagens selvagem e Δ <i>oppD</i> mutante de <i>C. pseudotuberculosis</i> na presença e ausência do substrato tóxico GSH. | 52 |
| Figura 7: Gel de agarose 1% contendo o resultado da PCR efetuada para confirmação molecular da inserção do plasmídeo no interior do gene <i>oppD</i> | 59 |
| Figura 8: Representação esquemática da estrutura gênica após o evento de recombinação homóloga simples (interrupção do gene <i>oppD</i>), e os fragmentos gerados pela PCR. | 60 |
| Figura 9: Tela do programa ARTEMIS contendo a organização gênica do operon (<i>oppBCDA</i>) no genoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 10: Representação do contexto genômico do operon opp em <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. (<i>oppBCDA</i>). | 62 |
| Figura 11: Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos do gene <i>oppD</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 63 |
| Figura 12: Resultado da análise das sequências dos genes codificadores das subunidades protéicas pertencentes ao transportador Opp através da ferramenta FGENESB. | 64 |
| Figura 13: Curvas de crescimento ($DO_{600nm} \times$ Tempo) das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante $\Delta oppD$ na presença e ausência do tripeptídeo GSH 5mM. | 66 |
| Figura 14: Curvas de crescimento ($DO_{600nm} \times$ Tempo) das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> 1002 selvagem (wt) e mutante $\Delta oppD$ na presença e ausência do tripeptídeo GSH 10mM | 66 |
| Figura 15: 2-DE das proteínas extracelulares da linhagem 1002 corado com <i>Coomassie</i> . Os spots marcados em verde indicam proteínas comuns entre as linhagens, e os marcados em vermelho proteínas tidas como exclusivas | 69 |
| Figura 16: 2-DE das proteínas extracelulares da linhagem mutante $\Delta oppD$ corado com <i>Coomassie</i> . Os spots marcados em verde indicam proteínas comuns entre as linhagens, e os marcados em vermelho proteínas tidas como exclusivas | 70 |
| Figura 17: Gráfico dos padrões de bactérias aderidas das linhagens selvagem e mutante após 1, 3 e 6 horas com as monocamadas de células J774. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. * Significativo em relação aos demais grupos testatos ($p < 0,05$). | 72 |
| Figura 18: Gráfico dos percentuais de <i>C.pseudotuberculosis</i> selvagem e mutante viáveis no interior de macrófagos murinos J774 após 1, 3 e 6 horas. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. * Significativo em relação aos demais grupos testatos ($p < 0,05$). | 72 |

Figura 19: Curva de sobrevivência dos camundongos BALB/c infectados com as linhagens selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*. O gráfico foi plotado com auxílio do software GraphPad Prism v.5.0. através do teste *Kaplan-Meier survival curve*.74

Figura 20: Unidades formadoras de colônia presentes no baço dos camundongos BALB/c infectados com as linhagens 1002(wt) selvagem e 1002($\Delta oppD$) mutante nos primeiros 5 dias de infecção.75

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas no trabalho..... | 43 |
| Tabela 2: Plasmídeos utilizadas no trabalho..... | 43 |
| Tabela 3: Meio quimicamente definido para cultivo de <i>C. pseudotuberculosis</i> | 44 |
| Tabela 4: Iniciadores usados na confirmação do mutante. | 49 |
| Tabela 5: Combinação dos iniciadores usados nas reações de PCRs para a confirmação do mutante em <i>oppD</i> | 49 |
| Tabela 6: Combinações de primers utilizados na PCR | 59 |
| Tabela 7: Locais de origem e hospedeiros das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> já sequenciadas | 64 |

Lista de abreviaturas

Termos técnicos

| | |
|----------|--|
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CDS | <i>Coding Sequence</i> |
| CLA | <i>Caseous Lymphadenitis</i> |
| CP | <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> |
| DL | Dose letal |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| D.O | Densidade Ótica |
| kb | Kilobases (1000 pares de bases) |
| kDa | <i>Kilodalton</i> |
| LC | Linfadenite Caseosa |
| LGCM | Laboratório de Genética Celular e Molecular |
| M | Molar |
| mg | Miligrama |
| ml | Mililitro (10 ⁻³ L) |
| mM | Milimolar |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| O.N. | <i>Overnight</i> |
| pb | Pares de bases |
| PLD | Fosfolipase D |
| q.s.p. | Quantidade suficiente para |
| rpm | Rotações por minuto |
| SDS-PAGE | Gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio |
| UFC | Unidade Formadora de Colônias |
| µg | Micrograma (10 ⁻³ g) |
| µl | Microlitro (10 ⁻³ L) |

Resumo

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, causadora da linfadenite caseosa (LC), uma doença infecto-contagiosa crônica que acomete pequenos ruminantes e acarreta sérias perdas econômicas para as atividades de ovinocaprinocultura. A ampla ocorrência e importância econômica da enfermidade estimulam estudos sobre as bases moleculares da virulência deste patógeno, cujas informações ainda são escassas. Dentre os fatores moleculares associados à virulência de bactérias patogênicas, têm-se destacado os internalizadores de peptídeos (Opp), que são complexos protéicos multi-subunitários, pertencentes à família dos ABC transportadores. Esses internalizadores ficam localizados na membrana plasmática e tem como principal função a captação de peptídeos do meio extracelular para que sirvam como fonte de carbono e nitrogênio. Além do papel nutricional os peptídeos podem ser utilizados, por bactérias Gram-positivas, como moléculas sinalizadoras em um processo de comunicação intercelular, o qual permite às bactérias coordenarem a expressão de determinados genes em uma escala populacional. O controle de diversos processos celulares já foi relacionado ao mecanismo de comunicação via peptídeos sinalizadores dentre os quais incluem: esporulação, conjugação e virulência. Com o objetivo de se estudar o papel do transportador de peptídeos (Opp) na bactéria *C. pseudotuberculosis* foi construída uma linhagem mutante para o transportador Opp utilizando um plasmídeo suicida. Essa linhagem foi crescida na presença do peptídeo tóxico glutationa (GSH) nas concentrações de 5mM e 10 mM, como forma de se obter uma confirmação fenotípica da perda da capacidade da linhagem mutante em internalizar peptídeos. Porém, a linhagem mutante se mostrou sensível aos efeitos tóxicos do GSH, demonstrando que esse peptídeo pode estar sendo internalizado pela bactéria por uma via diferente do Opp ou que não exista a necessidade dele ser internalizado para ser tóxico à bactéria. Posteriormente, através de uma análise proteômica comparativa entre as proteínas extracelulares das linhagens selvagem e $\Delta oppD$ mutante, utilizando 2-DE, foi gerado mapas protéicos que demonstraram a presença de 11 *spots* exclusivos na linhagem selvagem e 17 *spots* exclusivos na linhagem mutante. Esse resultado indica que o transportador Opp pode estar relacionado a algum processo de controle da expressão gênica em *C. pseudotuberculosis*. Por fim, para verificar se o transportador de peptídeos de *C. pseudotuberculosis* possui alguma relação com a virulência e patogenicidade dessa bactéria foram realizados ensaios *in-vitro*, de adesão e colonização de macrófagos, e *in vivo*, de infecção de camundongos BALB/c. Os resultados desses ensaios demonstraram que apesar da linhagem mutante possuir uma capacidade reduzida de aderir e infectar macrófagos em cultura durante a primeira hora de experimentação, ambas as linhagens apresentaram o mesmo potencial de causar morte, lesão, e de colonizar o baço de camundongos infectados. Através desse estudo podemos concluir que provavelmente a mutação do gene *oppD* não afetou a virulência da linhagem mutante. E que será necessário realizar o sequenciamento dos *spots* protéicos exclusivos de cada linhagem para que possamos inferir em quais processos celulares essas proteínas estão relacionadas.

Abstract

Corynebacterium pseudotuberculosis is a Gram-positive, facultative intracellular parasite, which causes caseous lymphadenitis (CL), a chronic infectious disease in small ruminants, generating great economic losses for sheep and goat producers. Its worldwide occurrence, economic gravity and scarce information stimulate studies on the molecular basis of *C. pseudotuberculosis* virulence mechanisms. Among molecular factors associated to virulence of many pathogenic bacteria, the oligopeptide importers (Opp), which are multi sub-unitary protein complexes belonging to the ABC transporters family, can be highlighted. These Opp are located in the membrane and their main function is to capture peptides from the extracellular environment to serve as carbon and nitrogen source. In addition to their nutritional role, these peptides may also be used by Gram-positive bacteria as signaling molecules in a process of intercellular communication, which allows bacteria to coordinate the expression of certain genes in a population scale. The control of several cellular processes has been linked to the signal peptides communication system, which include: sporulation, conjugation, and virulence. In order to study the role of the peptide transporter (Opp) in the *C. pseudotuberculosis* bacterium, a mutant strain for the Opp transporter was constructed using a suicide plasmid. This strain was grown in the presence of the toxic peptide glutathione (GSH) with concentrations of 5mM and 10 mM in order to confirm the lack of ability of the mutant strain to internalize peptides. However, the mutant strain was sensitive to the toxic effects of GSH, showing that this peptide could be internalized by the bacteria through a different mechanism than Opp transport system or that it may not need to be internalized to be toxic to bacteria. In addition, a comparative proteomic analysis between the extracellular proteins from wild and mutant strains using 2-DE, made it possible to generate protein maps showing the presence of 11 unique spots for the wild strain and 17 unique spots for the mutant strain. This result indicates that the transporter Opp may be related to some regulation process of gene expression in *C. pseudotuberculosis*. Finally, to verify if the peptide transporter of *C. pseudotuberculosis* has any relation to its virulence and pathogenicity, *in vitro* tests, adhesion and colonization of macrophages *in vivo* and infection assays of BALB/c mouse were carried out. The results of these tests showed that although the mutant strain has a reduced capacity to adhere and infect macrophages in culture during the first hour of experimentation, both strains showed the same potential to cause death, injury, and to colonize the spleens of infected mice. As such, we can conclude for this study that the *oppD* gene mutation did probably not affect the virulence of the mutant strain of *C. pseudotuberculosis* and that the individual protein spots of each strain should be sequenced to infer to which cellular processes these proteins are related

I. INTRODUÇÃO

I.1 Linfadenite caseosa

I.1.1 A doença

A linfadenite caseosa (LC) foi descrita pela primeira vez na Austrália em 1934 por Churchward e caracteriza-se como uma doença infecto-contagiosa crônica que acomete pequenos ruminantes (Collett *et al.*, 1994). Essa enfermidade é causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e gera severas perdas econômicas aos ovinocaprinocultores em todo o mundo (Dorella *et al.*, 2006a). A LC pode manifestar-se sob duas formas clínicas distintas: LC externa ou superficial e LC interna ou visceral, sendo que ambas podem ocorrer simultaneamente no mesmo animal. A forma externa é caracterizada pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais, principalmente parotídicos, submandibulares, poplíteos, pré-crurais, supramamários, pré-escapulares e em tecidos subcutâneos, sendo essa a forma clínica mais preponderante. Na LC visceral os abscessos se desenvolvem em nódulos linfáticos mediastínicos e bronquiais e em órgãos internos como pulmões, rins, fígado e baço (Merchant e Packer, 1967; Piontkowski e Shivvers, 1998; Scott, 2007). 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).

I.1.2 Impactos econômicos

O rebanho mundial de caprinos e ovinos contabilizado, em 2006, pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), foi de mais de 1,8 bilhões de cabeças. Desse total, 26,5 milhões estão presentes no Brasil fazendo com que o país ocupe o 8º lugar no *ranking* mundial. O rebanho brasileiro é constituído de 57% de ovinos e 43% de caprinos, sendo que a maior parte dos animais está concentrada nos estados da Região Nordeste. (IBGE, 2006).

O mercado mundial de corte para a ovinocaprinocultura vem apresentando crescimento contínuo ao longo dos últimos quarenta anos. Além de ser fonte de subsistência para muitas pessoas no mundo, o abate de caprinos e de ovinos vem conquistando grandes mercados consumidores, principalmente nos países populosos da Ásia (Zanella, 2007),

como China, Índia, Irã e Paquistão, que concentram juntos 40% da população mundial. Em 2005, o comércio internacional de carne de caprinos e ovinos somaram a cifra de US\$ 4,12 bilhões, sendo Austrália e França os maiores exportadores de carne caprina e Nova Zelândia e Austrália de carne ovina.

No Brasil, as estatísticas oficiais subestimam muito o verdadeiro tamanho da oferta e demanda pela carne de caprinos e ovinos, uma vez que grande parte dos rebanhos do país são abatidos e eviscerados pelos próprios criadores ou por marchantes avulsos (Campos, 1999). Estima-se que a ovinocaprino cultura brasileira produziu, em 2006, cerca de 120 mil toneladas de carne. Desse total, 65% referem-se à carne ovina (78 mil toneladas) e os 35% restantes (41 mil toneladas) à caprina.

Para se ter uma idéia do cenário atual e do potencial que a carne de cordeiro ainda pode atingir no Brasil, o consumo per capita/ano desse nicho é de 700g, número muito baixo, principalmente em comparação aos países onde mais se consome esse tipo de carne, como a Nova Zelândia, que tem uma média anual de 32kg por pessoa. Vale destacar que o Brasil ainda importa 10% da carne ovina e caprina que precisa para suprir sua demanda. E que para a população rural do semi-árido, os caprinos constituem a principal fonte de alimentação e de renda. (Disponível em: estadão.com.br/arquivo/economia/2006/not20060704p1387.htm)

Nesse contexto, por se tratar de uma doença debilitante, a LC acarreta perda de peso, redução da lactação, diminuição 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 ovinocaprino cultura (Aiello *et al.*, 1998; Williamson, 2001; Songer, 2005; Dorella *et al.*, 2009a).

I.1.3 Epidemiologia

A LC apresenta ocorrência mundial e é altamente prevalente em países onde a ovinocaprino cultura é intensa, tais 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). Minas Gerais (Região Sudeste), apesar de possuir um rebanho reduzido, vêm apresentando crescimento nas atividades de ovino e caprinocultura. A LC tem sido observada com alta frequência no estado, principalmente nos rebanhos da região norte de Minas, onde 84,3% dos produtores relataram ter problemas decorrentes da patologia (Faria *et al.*, 2004). Um estudo epidemiológico, realizado por nosso grupo de pesquisa em 205 propriedades do estado de Minas Gerais, indicou que a soroprevalência da LC no estado 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).

I.1.4 Transmissão

Geralmente, a LC é introduzida em rebanhos sadios por animais adquiridos de rebanhos em que há histórico de infecção por *C. pseudotuberculosis*. E uma vez presente no rebanho, a bactéria pode espalhar-se rapidamente entre os animais (Castro, 2009). A disseminação da doença se dá pelo contato direto com secreções provenientes do rompimento dos linfonodos superficiais, por aerossóis, que são gotas eliminadas na tosse e espirro de animais com abscessos pulmonares, ou através da presença de bactérias vivas no ambiente (Radostits *et al.*, 2002). O patógeno possui uma grande capacidade de sobrevivência fora do organismo hospedeiro, sendo oito meses no solo, quatro meses em galpões de tosquia e dois meses em feno e materiais contaminados. Este fator influencia bastante a disseminação da doença em criações que já possuem algum histórico (Radostits *et al.*, 2002).

Numerosas vias de inoculação, como intradérmica, subcutânea, intravenosa, intratraqueal, intravaginal e intralinfática, foram capazes de induzir infecções experimentais por *C. pseudotuberculosis* em ovelhas (Nagry, 1976; Burrell, 1978; Pepin *et al.*, 1994; Fontaine *et al.*, 2006). Entretanto, acredita-se que em infecções naturais, as principais rotas de transmissão sejam a ingestão de água e alimentos contaminados ou por ferimentos superficiais na pele, os quais podem ser causados tanto por procedimentos de manejo, (tosquia, castração, tratamento do cordão umbilical e agulhas contaminadas) quanto por fatores naturais (arbustos pontiagudos e espinhos) (Alves & Pinheiro, 1997).

I.1.5 Patogenia e imunologia

Após a penetração no hospedeiro, *C. pseudotuberculosis* é carregada ao linfonodo drenante local no interior de células fagocíticas. Esse processo decorre da habilidade dessa bactéria de existir como um parasita intracelular facultativo. A incapacidade de eliminação do patógeno pelos fagócitos é atribuída à presença da camada lipídica bacteriana e à resistência da bactéria ao óxido nítrico produzido pelos macrófagos (Bogdan *et al.*, 1997, Songer, 2005). Uma vez no interior dos linfonodos, iniciam-se ciclos de infecção, replicação e lise das células fagocíticas, culminando com formação de lesões necróticas e a colonização dos linfonodos (Jones *et al.*, 2000). Algumas vezes ocorre disseminação da bactéria pelo sangue ou pelo sistema linfático, levando a lesões similares em outros órgãos. Essa 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, os quais se iniciam com o aparecimento de células epitelióides que, posteriormente, são substituídas por necrose caseosa que é a característica predominante da doença. A massa caseosa vai sendo circundada por células epiteliais, linfócitos e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso. 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 da LC se desenvolvem vagarosamente, resultando em uma doença crônica que perdura muitas vezes por toda a vida do animal. Bactérias viáveis podem ser recuperadas de abscessos até vários anos depois da infecção inicial. Pode também ocorrer reativação da doença, com o desenvolvimento de lesões em novos sítios após um período considerável de cura aparente (Pepin *et al.*, 1994; Baird & Fontaine, 2007; McKean *et al.*, 2007a).

A formação de granulomas é um processo dependente da imunidade adaptativa que, nesse caso, é complexa e envolve tanto uma resposta imune humoral como celular, 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 (Pépin *et al.*, 1997). De acordo com Jolly (1965), a resolução da infecção causada 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.

I.1.6 Tratamento

O tratamento da doença pode ser realizado através do uso de antibióticos e pela drenagem e extirpação dos linfonodos superficiais acometidos. Contudo, essas não são consideradas estratégias eficientes. A primeira possui um custo elevado, e apesar da bactéria ser sensível a vários tipos de antibióticos *in vitro*, esses não são capazes de penetrar na cápsula dos abscessos, o que torna a terapia ineficaz (Aiello *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 2002). Na segunda não é possível eliminar todas as bactérias presentes nos linfonodos superficiais e quando esses estão localizados em órgãos internos torna-se impossível a aplicação do método (Alves e Pinheiro, 1997). Além da ineficiência no tratamento dos animais doentes, o processo de extirpação e drenagem dos linfonodos superficiais pode acarretar na contaminação do ambiente com o patógeno, pois a quantidade de bactérias liberada por um único abscesso é capaz de contaminar todo o rebanho. Com isso, a melhor estratégia para combater a doença é a profilaxia (Piontkowski e Shivers, 1998).

I.1.7 Profilaxia

Como não existe um tratamento efetivo contra a LC, faz-se necessário o uso de medidas profiláticas como forma de conter essa doença. Procedimentos de manejo como esterilização de instrumentos de uso comunitário; boa higienização das instalações (galpões, troncos de tosquia e baias de contenção); inspeção periódica de todos os animais do rebanho; manipulação dos animais sempre iniciada pelos mais jovens e o tratamento de feridas na pele com o uso de agentes bactericidas são medidas que podem reduzir bastante a incidência e a disseminação da doença nos rebanhos de caprinos e ovinos (Williamson, 2001, Dorella *et al.*, 2006). 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 à 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).

I.1.7.1 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da LC é baseado essencialmente na observação macroscópica dos abscessos superficiais externos. O teste definitivo, considerado como padrão-ouro, atualmente é realizado a partir do isolamento da bactéria diretamente do conteúdo caseoso dos linfonodos acometidos e cultivo bacteriológico, seguido por testes bioquímicos (Ribeiro *et al.*, 2001; Williamson, 2001). O teste bioquímico bem estabelecido para a identificação de bactérias corineformes é o sistema API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme lès Grottes, France). Esse método consiste de uma bateria de 21 testes bioquímicos que podem ser realizados entre 24 e 48 h. O sistema contém 20 tubos contendo substratos que permitem testes para 11 enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina, α -glucosidase, N-acetilglucosaminidase, β -glucoronidase, nitrato redutase, esculina

hidrolase e urease) e 8 testes de fermentação de carboidratos (glucose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sucrose e glicogênio).

Na busca por novos métodos diagnósticos para LC que não necessitem do cultivo bacteriológico, que sejam mais rápidos e que possuam baixo custo, Cetinkaya e cols. (2002) propuseram um teste molecular baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar isolados de *C. pseudotuberculosis* através da amplificação parcial da sequência 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, sequências 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* (Pacheco et al., 2007). 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. Atualmente esse método é considerado pelo Centro Francês de Referência em Corynebacterioses, localizado no Instituto Pasteur, o padrão-ouro para o diagnóstico da LC. Contudo, este método não é capaz de identificar o microrganismo em amostras sorológicas.

I.1.7.2 Vacinas

Como o tratamento da LC é de alto custo e ineficaz, a estratégia que apresenta melhor custo-benefício contra a doença é a imunoprofilaxia, entretanto ainda não existe uma vacina eficiente e protetora contra *C. pseudotuberculosis*. 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 perfringens*, *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 Shivvers, 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.

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.

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). Ensaios 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.

I.2 O gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo denominado CMNR inserido na classe das actinobactérias, o qual é composto pelos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. As espécies bacterianas pertencentes a este 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).

I.3 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, exibe formas pleomórficas que variam desde cocóides a bastões filamentosos e medem 0,5µm a 0,6µm por 1µm a 3µm de tamanho. Este microrganismo possui fimbrias, é imóvel, não possui cápsula e não esporula (Jones & Collins, 1986). 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).

C. pseudotuberculosis é o agente etiológico causador da doença denominada linfadenite caseosa, também conhecida como mal do caroço, essa enfermidade acomete populações de pequenos ruminantes em todo o mundo, causando significativas perdas econômicas (Williamson *et al.*, 2001; Paton *et al.*, 2003). Além de caprinos e ovinos *C. pseudotuberculosis* é capaz de infectar outras espécies de animais, como equinos, bovinos,

bubalinos, camelídeos e humanos, o que demonstra seu potencial zoonótico (Peel *et al.*, 1997; Selim, 2001; Williamson, 2001; Yeruham *et al.*, 2004). A infecção humana causada por *C. pseudotuberculosis* é um evento raro, sendo relatados na literatura apenas 25 casos (Mills *et al.*, 1997; Peel *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2005). A maioria das infecções humanas descritas envolveu o contato direto com animais doentes ou a exposição a produtos animais contaminados, indicando que a doença geralmente está associada a atividades profissionais. A sintomatologia, como anteriormente descrita, envolve a presença de linfadenite e de abscessos nos nódulos linfáticos (Peel *et al.*, 1997).

I.3.1 Propriedades bioquímicas

As reações bioquímicas de isolados de *C. pseudotuberculosis* variam consideravelmente, principalmente quanto às 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). A produção de nitrato redutase foi utilizada por Biberstein e cols. (1971) para distinguir o biovar *equi* (isolado de equino e bovino; redução de nitrato positiva) do biovar *ovis* (isolado de ovino e caprino; redução de nitrato negativa).

I.3.2 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 equinos 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 microorganismos 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 nucleicos e análises de sequências do gene *16S rRNA* 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 biovars *equi* e *ovis* de *C. pseudotuberculosis* não devem ser classificados como subespécies, devido à sua grande similaridade genômica. Recentemente, foi verificado que análises de sequências 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).

I.3.3 Projeto Genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Devido a sua grande importância na sanidade animal, diversas linhagens de *C. pseudotuberculosis* tiveram os seus genomas completamente sequenciados e depositados no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cabe ressaltar que o primeiro genoma integralmente sequenciado e anotado no estado de Minas Gerais foi o de *C. pseudotuberculosis*.

O genoma de *C. pseudotuberculosis* possui um tamanho médio de 2.3Mb com um conteúdo G+C de 52% e aproximadamente 2 mil ORFs preditas. Esses dados mostram que esse genoma além de ser um dos menores dentre as espécies do gênero *Corynebacterium* já sequenciadas até o momento, apresenta um repertório genético pequeno, uma vez que possui cerca de 1.200 genes a menos que outras bactérias não patogênicas do gênero, como *C. glutamicum*. Essas características podem ser explicadas pelo fato de *C. pseudotuberculosis* ser um patógeno intracelular facultativo. A sintonia gênica entre as linhagens já sequenciadas é de aproximadamente 97% demonstrando que a disposição dos genes é bem conservada entre as linhagens de *C. pseudotuberculosis*.

I.3.4 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.

I.3.4.1 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 desde então, tem sido detectada em todas as linhagens isoladas deste microrganismo (Songer *et al.*, 1988). Essa proteína é um fator de permeabilidade que promove a hidrólise de ligações éster na esfingomielina 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 linhagens mutantes, nos quais o gene *pld* foi inativado do cromossomo, através de mutagênese sítio-específica. Estes mutantes demonstraram incapacidade de se disseminar e induzir o desenvolvimento da linfadenite caseosa; e, além disso, eles induziram uma resposta imunológica protetora, embora não totalmente satisfatória contra *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1992).

A disseminação da bactéria por ação da PLD pode ser explicada pela ação dermonecrótica que a mesma exerce sobre as células endoteliais. A exotoxina promove o aumento da permeabilidade vascular, fazendo com que haja 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 proteína 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, sequenciado 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). Estudos recentes avaliaram o controle da expressão do gene *pld* sob diferentes condições e concluíram que este fator de virulência tem sua expressão reduzida quando *C. pseudotuberculosis* é exposta ao choque térmico (43°C), ao passo que sua expressão é aumentada durante a infecção de macrófagos e em situações de alta densidade populacional bacteriana demonstrando algum controle via *quorum sensing* (McKean *et al.* 2007a; 2007b).

I.3.4.2 Lipídeos tóxicos da parede celular

Os lipídeos associados à parede celular de *C. pseudotuberculosis* são semelhantes ao ácido micólico de *M. tuberculosis* e foram descritos há muito tempo como importantes fatores para a patogênese da doença (Hard, 1972). De acordo com Jolly (1966), esta camada atua no mecanismo de virulência da *C. pseudotuberculosis*, conferindo proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos além de possuir efeito citotóxico.

A toxicidade do material lipídico 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.

I.3.4.3 Novos candidatos

Devido à escassez de informações sobre as bases moleculares de virulência e patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*, trabalhos recentes vêm tentando identificar novos determinantes moleculares que contribuem para a virulência deste patógeno. Billington e cols (2002) demonstraram que quatro genes, dispostos no genoma na forma de operon, designados *fag A*, *B*, *C* e *D*, têm um papel importante 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 desse metal 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).

Em 2005 McKean e colaboradores utilizaram a técnica de “Indução Diferencial de Fluorescência” (*DFI-Differential Fluorescence Induction*) para identificar genes que são diferencialmente expressos nessa bactéria durante a infecção de macrófagos; dentre os fatores mais expressos destacaram-se uma sintetase peptídica não ribossômica e uma subunidade da enzima propionil-CoA-carboxilase (McKean *et al.*, 2005).

Utilizando uma estratégia diferente baseada na busca randômica por genes através de *Genome Survey Sequence* (GSSs - sequências nucleotídicas parciais provenientes de DNA genômico) nosso grupo de trabalho (Laboratório de Genética Celular Molecular; ICB/UFMG) identificou o gene *oppD*. Esse gene codifica uma subunidade protéica pertencente a um sistema de captação e transporte de peptídeos do meio extracelular para o meio intracelular e é responsável pela clivagem de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), fornecendo energia para o processo de internalização de peptídeos (D’Afonseca *et al.*, 2010). Esses transportadores de peptídeos além de possuírem um papel importante na nutrição da célula, também participam na regulação de vários processos que envolvem o fenômeno de sinalização intercelular, dentre os quais inclui-se o controle da expressão de genes relacionados à virulência em bactérias patogênicas (Coulter *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2001; Samen *et al.*, 2004).

I.4 Internalizadores de peptídeos (Opp) bacterianos

Os internalizadores de peptídeos bacterianos, em sua grande maioria, pertencem à família protéica dos ABC transportadores (*ATP-binding cassette*). Essa família se caracteriza por utilizar a energia gerada pela hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) para impelir o transporte de várias classes de moléculas como lipídeos, peptídeos e sacarídeos através da membrana plasmática (Monnet, 2003; Braibant *et al.*, 2000).

Os transportadores Opp já foram identificados e caracterizados em diversas espécies bacterianas, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Eles são compostos comumente por 5 subunidades protéicas geralmente denominadas OppA, OppB, OppC, OppD e OppF (Figura 1). Do ponto de vista genético os genes codificadores dessas subunidades estão organizados na forma de operon, *oppABCDF*, (Figura 2) sendo que a alteração na disposição gênica, a presença de mais de uma cópia e também a fusão de subunidades são eventos que já foram observados no genoma de algumas bactérias (Hiron *et al.*, 2007).

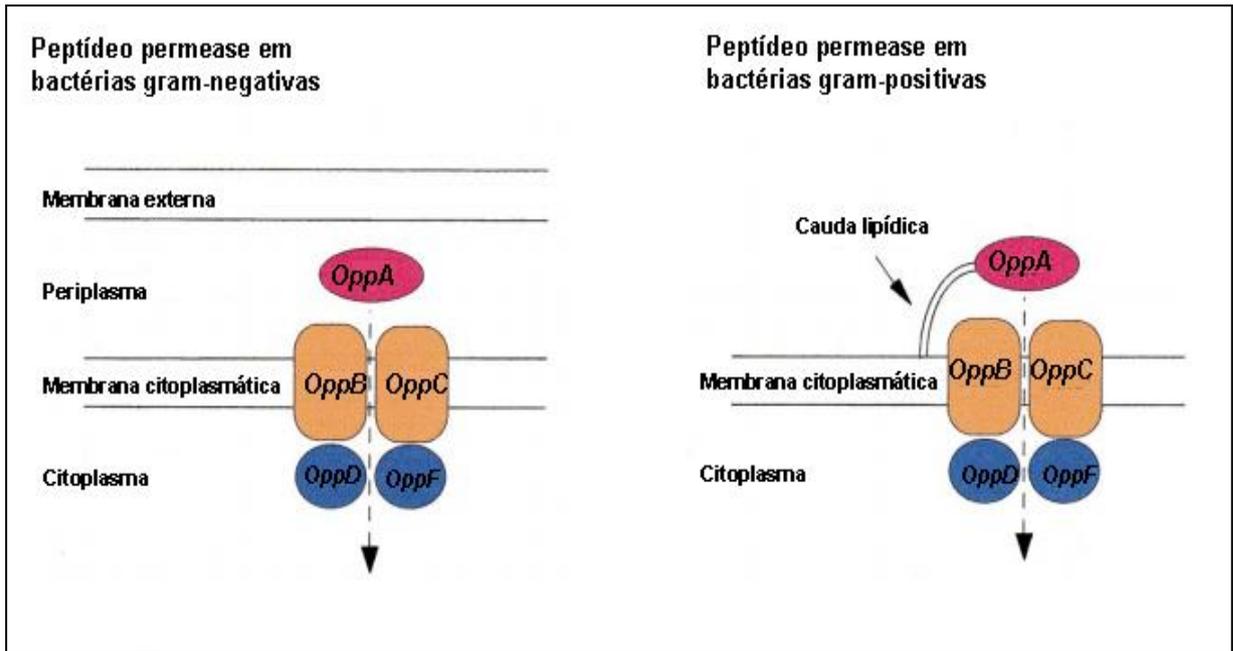


Figura 1. Representação esquemática das proteínas do transportador de peptídeos em bactérias Gram-negativas e positivas. Adaptado: Braibrant *et al.*, 2000



Figura 2. Representação da estrutura gênica mais comum do operon *opp*. *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD*, *oppF*. Adaptado: Braibrant *et al.*, 2000

A subunidade OppA é responsável pela captura dos peptídeos do meio extracitoplasmático e transferência dessas moléculas às proteínas formadoras do canal transmembrânico (OppB e OppC). Devido a essa função, a OppA é que determina a especificidade do transporte uma vez que só serão internalizados os peptídeos que forem capazes de se ligar a ela. Acredita-se que o mecanismo de ligação substrato-proteína utilizado pela OppA seja similar ao encontrado na planta carnívora *Dionea muscipula* para capturar insetos, denominado “*Venus-flytrap*”. Nesse mecanismo o sítio de ligação ao substrato é formado por uma fenda localizada entre dois domínios os quais são conectados por uma haste em forma de “dobradiça” conforme ilustrado na figura 3 (Quiocho e ledvina, 1996). Em bactérias Gram-negativas essa subunidade se encontra livre no espaço periplasmático ao passo que em Gram-positivas se encontra ancorada à membrana plasmática via motivo de ligação NH₂-terminal (Detmers *et al.*, 2001).

As subunidades OppB e OppC são responsáveis pela formação do canal transmembrânico pelo qual os oligonucleotídeos serão transportados para o meio intracelular. Elas consistem de quatro a oito α -hélices formadas por aminoácidos hidrofóbicos que atravessam a membrana plasmática formando um poro (Braibant *et al.*, 2000).

As subunidades OppD e OppF estão localizadas no lado citoplasmático da membrana bacteriana e são responsáveis pela hidrólise da molécula de ATP gerando energia para o processo de internalização dos peptídeos.

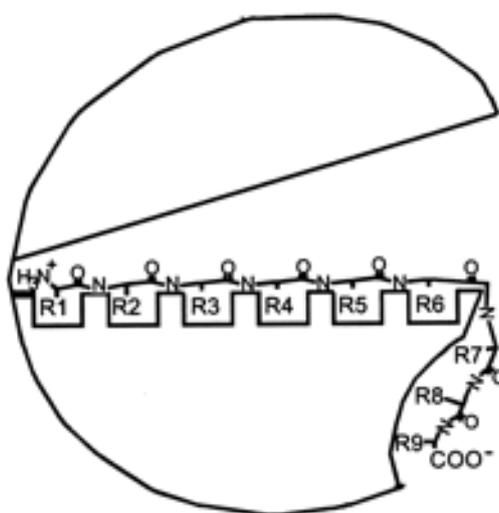


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ligação a peptídeos pela subunidade OppA. Adaptado: V. Monnet, 2003

A principal função do Opp em bactérias é provavelmente a aquisição de peptídeos para que sejam utilizados como fonte de carbono e nitrogênio. Tais peptídeos são uma valiosa forma de nutrientes, especialmente para microorganismos auxotróficos para diversos aminoácidos. Segundo Payne e cols. (1968) a taxa de crescimento de algumas bactérias pode ser aumentada quando aminoácidos essenciais estão contidos em peptídeos (Payne *et al.*, 1968). Corroborando com essas hipóteses estudos realizados com a bactéria *Lactococcus lactis* demonstraram que a presença de um sistema de transporte de peptídeos funcional é necessária para que a bactéria seja capaz de crescer no leite (Smid *et al.*, 1989) e que uma linhagem de *Listeria monocytogenes*, auxotrófica para o aminoácido treonina, possui um baixo potencial de crescimento em meios de cultura contendo esse aminoácido na forma livre mas cresce muito bem quando ele está presente em peptídeos (Marquis *et al.*, 1993).

A aquisição de nutrientes é crucial na sobrevivência de bactérias que possuem em seu ciclo de vida a colonização do meio intracelular, como é o caso de *C. pseudotuberculosis*, uma vez que em alguns estágios e compartimentos dessa via de infecção a disponibilidade de nutrientes como ferro e aminoácidos pode ser severamente limitada. Em um estudo realizado com o parasita intracelular *Salmonella typhimurium* em que foi avaliada a necessidade da presença do aminoácido glutamina para a sobrevivência do patógeno, uma linhagem mutante com deficiência na síntese e no transporte de alta afinidade por esse aminoácido apresentou uma sobrevivência reduzida no interior de macrófagos, demonstrando que a disponibilidade desse aminoácido no meio intracelular é limitada (Klose *et al.*, 1997). Em 1993 Marquis e cols avaliaram o crescimento intracitoplasmático e a virulência de mutantes auxotróficos de *L. monocytogenes* para diversos aminoácidos, esse estudo revelou que a bactéria pode utilizar peptídeos intracelulares como fonte de aminoácidos essenciais. Esses experimentos sugerem que os transportadores de nutrientes possuem um papel crucial na sobrevivência no meio intracelular.

Além de servirem como fonte de nutrientes, peptídeos vêm sendo caracterizados como moléculas sinalizadoras em bactérias Gram-positivas, e já foram relacionados ao controle de diversos processos celulares como: virulência, formação de biofilme, adesão, esporulação, dentre outros (Sturme *et al.*, 2002). O fenômeno de sinalização através de peptídeos frequentemente está relacionado ao mecanismo de comunicação intercelular, conhecido como *Quorum sensing*, o qual permite que as bactérias modifiquem processos celulares em resposta à densidade populacional. Isso é possível devido ao fato desses peptídeos serem capazes de se difundir para o meio extracelular, aumentando sua concentração no meio circundante à medida que aumenta a densidade populacional, e quando a concentração do sinalizador atinge certo limiar, a bactéria secretora passará a perceber e a responder ao peptídeo sinalizador (Lazazzera, 2001).

O mecanismo de comunicação celular através de peptídeos pode ser dividido em duas categorias. Na primeira, os peptídeos sinalizadores se ligam a receptores ancorados externamente na membrana plasmática. Na segunda, as proteínas receptoras se encontram dispersas no citoplasma da célula bacteriana. Para que esta via de comunicação aconteça é necessário que esses peptídeos sejam ativamente transportados para o interior da célula pois eles não são capazes de se difundir livremente através da membrana plasmática. Essa função de captação e internalização dos peptídeos sinalizadores é exercida pelos transportadores Opp. (Lazazzera, 2001).

O processo de comunicação via peptídeos ao qual o transportador Opp está relacionado já foi bem caracterizado em espécies do gênero *Bacillus* e *Enterococcus* (Perego *et al.*, 1996; Leonard *et al.*, 1996). Em ambos os casos os peptídeos sinalizadores são transcritos e traduzidos em cadeias polipeptídicas imaturas que devem ser submetidas a no mínimo dois eventos de modificação pós-traducionais para que se transformem na forma madura. Após sofrerem mudanças no citoplasma as moléculas sinalizadoras são exportadas via sistema-Sec como pro-peptídeos, os quais serão submetidos a modificações no meio extracelular para que se transformem na forma ativa. A maneira exata de como essas modificações ocorre ainda não é bem compreendida (Figura 4) (Lazazzera, 2001).

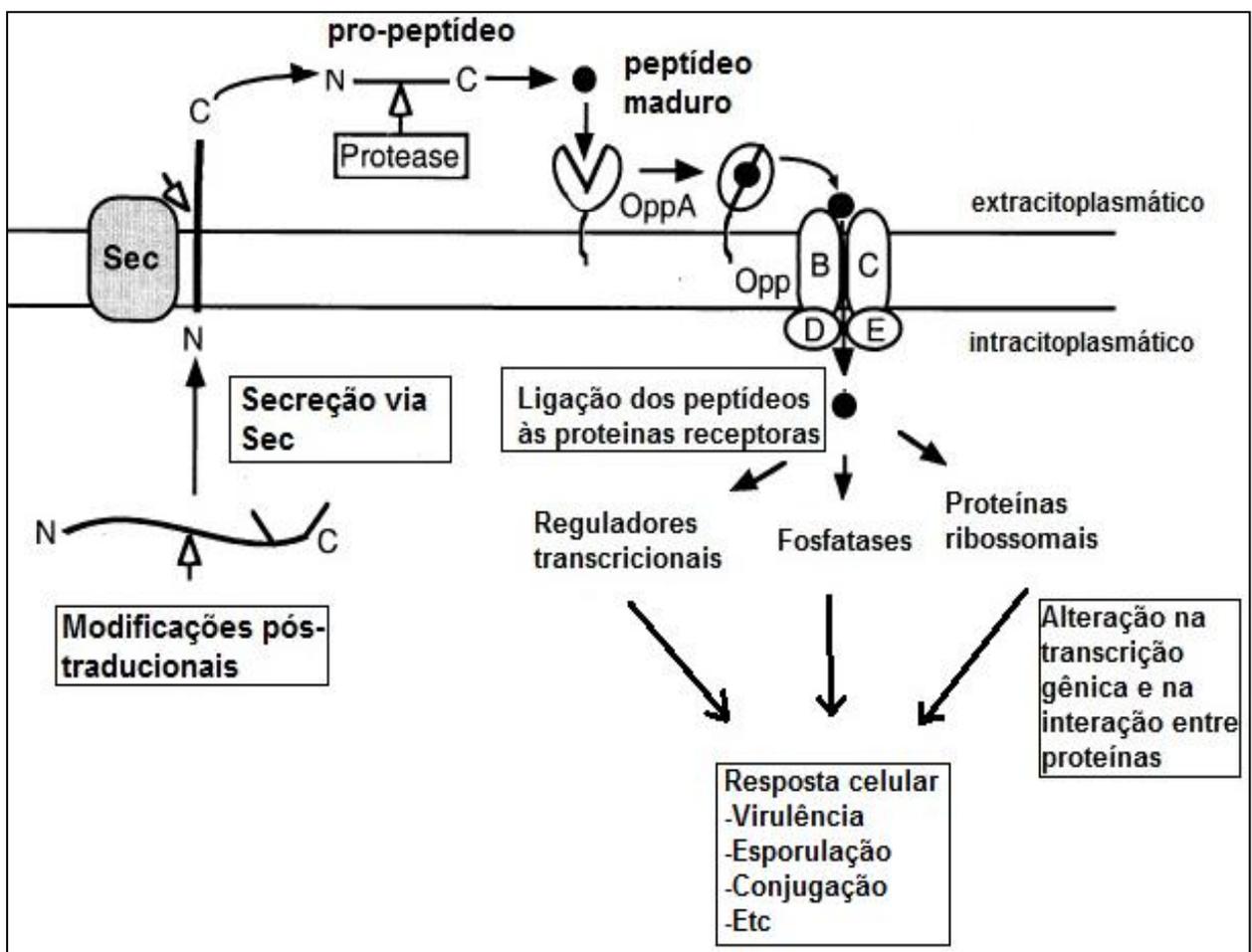


Figura 4. Representação esquemática do processo de comunicação celular envolvendo peptídeos sinalizadores e os transportadores Opp. Adaptado: Lazazzera, 2001

Com a constante liberação no meio circundante a concentração desses peptídeos ativos vai aumentando à medida que vai crescendo a população bacteriana e quando a quantidade desses peptídeos sinalizadores atinge certo limiar eles são carreados para o interior da célula através do transportador Opp. Uma vez no citoplasma, esses peptídeos interagem com receptores intracelulares, que podem ser reguladores transcricionais, fosfatases e proteínas ribossomais, alterando a transcrição de genes e a interação entre proteínas; o que permite que a bactéria altere seu repertório protéico em resposta às alterações ambientais (Figura 4) (Lazazzera, 2001).

Evidências do envolvimento do Opp em mecanismos de sinalização através de peptídeos já foram relatadas em diversos estudos nos quais linhagens mutantes para este transportador foram incapazes de responder aos sinalizadores (Leonard *et al.*, 1996, Perego *et al.*, 1991).

Visto que os peptídeos são moléculas extremamente importantes para as bactérias, seja como forma de nutrientes seja como moléculas sinalizadoras, o seu papel na virulência de patógenos vem sendo amplamente estudado através da criação de mutantes incapazes de adquiri-los do meio extracitoplasmático. Um estudo feito com *Staphylococcus aureus* visando à busca de novos fatores de virulência através da inserção randômica de transposons no genoma dessa bactéria, demonstrou que alguns dos mutantes gerados possuíam capacidade reduzida de replicação e sobrevivência em diversos modelos de infecção. Ao se identificar os genes nocauteados nas linhagens onde a virulência havia sido reduzida, observou-se que a maioria deles codificava proteínas relacionadas ao transporte de peptídeos (Coulter *et al.*, 1998).

Trabalhos realizados com espécies do gênero *Streptococcus* também relacionaram o transportador Opp à virulência dessas bactérias. Em um estudo feito por Wang e cols. (2005) com *Streptococcus pyogenes* foi demonstrado que a mutação da subunidade OppA levou a uma redução no nível transcricional de diversos genes relacionados à virulência desse patógeno e que linhagem $\Delta oppA$ mutante possuía uma menor capacidade de causar morte e lesão tecidual em camundongos BALB/c. Samen e cols (2004) observaram que uma linhagem mutante de *Streptococcus agalactiae*, espécie bacteriana causadora de septicemia, meningite e pneumonia em recém nascidos, deficiente no transporte de peptídeos apresentou uma redução na aderência a células epiteliais. Essa redução foi relacionada a uma diminuição na expressão do gene *fbSA*, que codifica uma proteína de ligação ao fibrinogênio.

Ainda não existem estudos publicados sobre o papel do transportador Opp em bactérias do gênero *Corynebacterium*. Porém trabalhos realizados com espécies de

Mycobacterium sp., um táxon filogeneticamente próximo a *C. pseudotuberculosis*, demonstraram que o Opp possui um papel importante na virulência dessas espécies.

Através de mutagênese com o emprego de transposons, Stewart e cols (2005) obtiveram uma linhagem de *M. bovis* que apresentava uma capacidade reduzida de sobreviver no interior de macrófagos murinos. Ao fazer o sequenciamento do DNA dessa linhagem foi observado que o transposon havia se inserido no interior do operon *opp*, demonstrando que o internalizador de peptídeos está relacionado à virulência dessa espécie bacteriana.

Através de estudos com *M. tuberculosis* H37Rv, Sasseti e cols (2003) relataram que a presença do transportador Opp funcional é necessária para manutenção da infecção após a injeção intravenosa dessa bactéria em camundongos C57BL/6. Em 2009 Flores-Valdez e cols. demonstraram que o transportador Opp está relacionado à virulência de *M. tuberculosis* uma vez que camundongos infectados com a linhagem mutante para o transportador apresentaram uma carga bacteriana reduzida em órgãos como pulmões e baço em comparação com infecções ocasionadas pela linhagem selvagem durante a fase crônica da infecção. Essa diminuição da virulência foi atribuída a uma alteração na composição dos lipídeos presentes na parede celular bacteriana, os quais são caracterizados como um importante fator de virulência de *M. tuberculosis*.

Os trabalhos supracitados demonstram o importante papel dos transportadores de peptídeos Opp na virulência de diversas espécies de bactérias patogênicas inclusive em espécies filogeneticamente próximas à *C. pseudotuberculosis*.

Neste contexto a proposta do presente trabalho foi de estudar o papel do operon Opp em *Corynebacterium pseudotuberculosis* através da geração de uma linhagem mutante com a interrupção do gene *oppD* por evento de recombinação homóloga simples. O nocaute do gene *oppD* pressupõe a inativação de todo o sistema de transporte pois este gene codifica a proteína responsável por fornecer energia ao processo de internalização de peptídeos através da hidrólise de ATP (Higgins, C.F. 1992). Após a obtenção e confirmação da linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* foram efetuados testes para comprovarmos a perda de função do transportador. Essa linhagem mutante também foi avaliada quanto a sua virulência através de testes de infecção em camundongos a fim de analisar a persistência da infecção e as taxas de mortalidade, além de ensaios de adesão e infecção de macrófagos.

II. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA REALIZAÇÃO DO PROJETO

A LC é reconhecidamente uma das principais limitações para o aprimoramento da criação de pequenos ruminantes em todo mundo, causando perdas econômicas significativas para os ovinocaprinocultores. Em países como a Austrália, que possui grandes rebanhos de ovinos, estudos definiram que as perdas econômicas derivadas da LC chegam a 17 milhões de dólares por ano (Paton *et al.*, 2003; Baird e Fontaine, 2007). Os prejuízos ocasionados por essa enfermidade são provenientes da redução na produção de lã, carne e leite, e também da condenação das carcaças e peles dos animais infectados (Williamson, 2001; Dorella *et al.*, 2009).

Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias que visem o tratamento e a erradicação da LC. Para tanto é necessário preencher diversas lacunas, como: a criação de novos métodos de tratamento, visto que a antibioticoterapia é uma estratégia cara e ineficaz; a criação de vacinas mais eficientes, pois as vacinas disponíveis no mercado não oferecem a proteção necessária contra a infecção e por fim desenvolver métodos diagnóstico, pois a presença de animais com infecção sub-clínica no rebanho é um grande propulsor para dispersão da doença.

O conhecimento acerca dos determinantes moleculares de virulência de patógenos tem auxiliado no combate as doenças geradas por eles, uma vez que essas moléculas podem servir como alvo para atuação de fármacos, desenvolvimento de cepas atenuadas, confecção de métodos diagnósticos, além de ampliar o entendimento sobre o desenvolvimento da doença. Apesar da grande importância econômica da LC, poucos genes relacionados à virulência de *C. pseudotuberculosis* já foram caracterizados.

Assim, com o objetivo de se ampliar o conhecimento acerca dos genes relacionados aos mecanismos de virulência de *C. pseudotuberculosis* visando o controle e a erradicação da linfadenite caseosa, foi construída uma linhagem mutante através da inativação do transportador de peptídeos Opp, o qual já foi descrito como peça chave no processo de aquisição de nutrientes e mecanismos de comunicação relacionado ao controle da expressão de genes de virulência em diversas bactérias patogênicas inclusive em *Mycobacterium tuberculosis*, uma espécie bacteriana filogeneticamente próxima a *C. pseudotuberculosis*.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo Geral

Caracterizar o internalizador de oligopeptídeos Opp em *Corynebacterium pseudotuberculosis* e avaliar o seu papel na virulência e na patogenicidade dessa bactéria.

III.2 Objetivos específicos;

- Identificar e caracterizar o operon *opp* no genoma de *C. pseudotuberculosis* através de análises *in-silico*;
- Construir uma linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis*, com interrupção do gene *oppD* através do evento de recombinação homóloga simples;
- Padronizar um teste fenotípico com o intuito de confirmar a perda da função da linhagem mutante no transporte de peptídeos;
- Comparar o perfil de expressão de proteínas secretadas entre as linhagens selvagem (wt) e mutante ($\Delta oppD$).
- Comparar a capacidade das linhagens Wt e $\Delta oppD$ em infectar e aderir a macrófagos em cultura;
- Infectar experimentalmente camundongos BALB/c com as linhagens wt e $\Delta oppD$ a fim de comparar a persistência da infecção e as taxas de mortalidade.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Reagentes e kits de biologia molecular

1 kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen)

Acetato de Amônio PA (Amersham Biosciences)

Acetato de Potássio PA (Synth)

Ácido Acético glacial (Merck)

Ácido Bórico PA (Cirq)

Ácido ortofosfórico (Merck)

Ágar bacteriológico (bioBRÁS)

Agarose (Eurobio)

Água mili-Q autoclavada

Álcool etílico (Merck)

Álcool isoamílico (Synth)

Álcool isopropílico (Merck)

Ampicilina (Sigma)

Acrilamida (Promega)

Azul de Bromofenol (Synth)

BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Brain Heart Infusion (Oxoid)

Brometo de Etídio (Eurobio)

Butanol (Synth)

Circlegrow (MP Biomedicals)

Cloreto de amônio PA (CRQ)

Cloreto de cálcio PA (Synth)

Clorofórmio (Cirq)

DMEM (Sigma)

DTT (GE-Healthcare)

Extrato de levedura (Biobrás)

EDTA PA (Synth)

Fosfato de potássio monobásico (VETEC)

Fosfato de sódio dibásico (VETEC)

Glicerina (Synth)

Glicina (VETEC)

Glicogênio (Gibco)

Glicose (Merck)

HCl (Merck)
Lisozima (USB)
Metanol (Merck)
MgCl₂ (Invitrogen)
NaCl PA (Cirq)
NaOAc PA (Synth)
NaOH PA (Cin. Química)
Peptona (OXOID)
Persulfato de amônio (Gibco)
Polímero de performance POP-6™ para ABI3100 (Applied Biosystems)
RNase A (Invitrogen)
Sulfato de magnésio PA (Synth)
Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
Taq DNA Polymerase (Quiagen)
Tryptone soy broth (Biokar diagnostics)
Tris-base (Invitrogen)
Tween-80 (Merck)
Tween-20 (Merck)
UltraPure™ Buffer-Saturated Phenol (Invitrogen)
Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)
Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega)

IV.2. Soluções e meios de cultura

Acetato de Potássio 3M: 60 mL de KOAc 5M; 11,5 mL de Ácido acético glacial e 28,5 mL de água ultrapura autoclavada.

Acetato de Sódio 3M: 246 g NaOAc em q.s.p. de 1 L água destilada.

Ampicilina (100 mg/mL): 1 g da solução de ampicilina em q.s.p. de 10 mL de água ultrapura autoclavada.

Brometo de etídio: Solução 0,1-0,5 µg/mL.

Cloreto de Sódio 5M: 14,51 g de NaCl em q.s.p. de 50 mL de água destilada.

EDTA 0,5M: 18,61 g de EDTA em q.s.p. de 100 mL de água destilada; pH 8,0.

Etanol 70%: 70 mL de etanol absoluto e 30 mL de água destilada.

Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1): 25 mL de solução saturada de fenol; 24 mL de clorofórmio; e 1 mL de álcool isoamílico.

GET: 23 mL de glicose 20%; 10 mL de EDTA 0,5M pH 8,0 autoclavado; 13 mL de Tris-HCl 1M, pH 7,4 em q.s.p. de 500 mL de água ultrapura.

GET com RNAase: 25 ml de solução GET e 250 µL de RNase (10 mg/ml).

Glicerol 10%: 100 mL de Glicerina em q.s.p. de 1L de água destilada

Glicerol 80%: 80 mL de Glicerina em 50 mL de água destilada.

Glicogênio (20mg/ml): 100 mg de glicogênio em q.s.p. de 5 mL de água destilada.

Glicose 20%: 20 g de glicose em q.s.p. de 100 mL de água ultrapura.

Glicose 50%: 50 g de glicose em q.s.p. de 100 mL de água ultrapura.

Hidróxido de Sódio 4M: 8 g em q.s.p. de 40 mL de água ultrapura.

Meio Circlegrow[®]: 40g em q.s.p. de 1 L de água destilada. Autoclavação por 20 min a 120°C.

Meio BHI-caldo: 37 g de BHI em pó em q.s.p. de 1 L de água destilada; pH 7,4. Autoclavação por 20 min a 120°C.

Meio BHI-caldo contendo Tween 80: BHI caldo e 0,05% de Tween 80. Autoclavação por 20 min a 120°C.

Meio BHI – ágar-canamicina: BHI – ágar acrescido de canamicina (50 µg/mL).

Meio Luria-Bertani (LB): Peptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH 7,8. Autoclavação por 20 min a 120°C.

Meio LB-ágar: Peptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L e 15 g de ágar bacteriológico. pH 7,8. Autoclavação por 20 min a 120°C.

Meio LB-ágar-X-gal- Ampicilina: Meio LB-ágar acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e X-Gal (40 µg/mL).

PBS-T: A solução estoque de PBS 10X concentrado foi realizado com: 0,5 M de NaH₂PO₄; 650 mL de água ultrapura; Aferir o pH para 7,4; A cada 100 mL da solução adicionar 9 g de NaCl; Diluir 1:10 em água ultrapura; Adicionar Tween-20 0,05%.

Sarcosil 30%: 30 g de sódio-N-lauroilsarcosina em q.s.p. de 100 mL de água destilada.

SDS 10%: 10 g de Dodecil sulfato de sódio em q.s.p. de 100 mL de água destilada.

Tampão de amostra 5X (DNA): Glicerol a 50%; Azul de bromofenol a 0,20%; e solvente TBE a 2,5 X.

TBE 5X: 216 g de Tris-base; 110 g de ácido bórico; 80 ml de EDTA (0,5 M; pH 8,0); completar com H₂O para 4 L; ajustar o pH 8,0 - 8,5.

Tris-EDTA-RNase (Solução I – Extração de DNA genômico): Tris-HCl 10 mM; EDTA (10 mM); NaCl 300 mM; RNase A (50 µg/mL).

Tris-EDTA-lisozima (Solução II – Extração de DNA genômico): Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM; NaCl 300 mM; lisozima (10 mg/mL).

Tris-HCl 1M: 12,11 g Tris-HCl em q.s.p. de 100 mL de água destilada; pH 7.

IV.3. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Os meios de cultivo utilizados foram o LB para *E. coli* e o BHI para *C. pseudotuberculosis*. Estes meios foram suplementados com 1,5% de ágar bacteriológico para cultura em meio sólido. Ambas as culturas foram crescidas a 37°C sob agitação. O cultivo de *E. coli* foi realizado em 18 horas e de *C. pseudotuberculosis* em 72 horas. Para extração das proteínas extracelulares as linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas em meio quimicamente definido (Tabela 3) a 37°C como descrito por Moura-Costa e cols. (2002), até atingirem ponto definido do crescimento exponencial (Densidade óptica a 600nm = 2.0). Quando necessário, os meios de cultura foram suplementados com ampicilina (100µg/mL) ou canamicina (50µg/mL).

TABELA 1: Linhagens bacterianas utilizadas no trabalho.

| Espécie | Linhagem / Genótipo | Fonte |
|--|--|---------------|
| <i>Escherichia coli</i> | DH5 α [<i>sup44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>] | Invitrogen |
| <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> ^a | Linhagem 1002 | UFBA |
| <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | Linhagem Δ <i>oppD</i> | Este trabalho |

^a: linhagem de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* pertencente à coleção de microorganismos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.

TABELA 2: Plasmídeos utilizadas no trabalho

| Plasmídeos | Características | Fonte |
|--|--|---------------|
| pCR [®] 2.1-TOPO [®] | Vetor de clonagem/ <i>Am</i> ^r - <i>Km</i> ^r /pUC ORI | Invitrogen |
| pCR [®] 2.1-TOPO [®] : <i>OppD</i> | Vetor de clonagem pCR [®] 2.1-TOPO [®] contendo o fragmento da ORF <i>oppD</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> | Este trabalho |

Am^r: resistência à ampicilina

Km^r: resistência à canamicina

TABELA 3: Meio quimicamente definido para cultivo de *C. pseudotuberculosis*.

| <i>Tampão Fosfato (g/L)</i> | <i>Vitaminas (g/L)</i> | <i>Aminoácidos (g/L)</i> |
|--|--------------------------|--------------------------|
| Na ₂ HPO ₄ 12,93 | Pantotenato de Ca 0,0040 | Arginina 0,0632 |
| KH ₂ PO ₄ 2,55 | Cloreto de Colina 0,0040 | Cisteína 0,0120 |
| NH ₄ Cl 1,00 | Ácido Fólico 0,0040 | Histidina 0,0210 |
| CaCl ₂ 0,02 | Inositol 0,0080 | Isoleucina 0,0263 |
| MgSO ₄ 0,20 | Niacinamida 0,0040 | Leucina 0,0262 |
| Glicose (50%) 4% | Piridoxal 0,0040 | Lisina 0,0363 |
| | Riboflavina 0,0004 | Metionina 0,0076 |
| | Tiamina HCl 0,0040 | Fenilalanina 0,0165 |
| | | Treonina 0,0238 |
| | | Triptofano 0,0051 |
| | | Tirosina 0,0180 |
| | | Valina 0,0234 |
| | | Alanina 0,0089 |
| | | Asparagina 0,0132 |
| | | Ác. Aspártico 0,0133 |
| | | Ac. Glutâmico 0,0133 |
| | | Glicina 0,0075 |
| | | Serina 0,0105 |

Fonte: Adaptado de Moura-Costa *et al.* (2002).

IV.4. Manipulação do DNA

Todos os protocolos de manipulação de DNA, de qualquer origem, foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook *et al.*, 1989), com modificações quando necessárias. A qualidade do material obtido após a manipulação do DNA, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada após leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, além de resolução eletroforética em gel de agarose 1%. Todo o DNA obtido nesse trabalho foi conservado a -20° C.

IV.5. Resolução eletroforética

Para a avaliação da qualidade do DNA (genômico ou plasmidial) através de resolução eletroforética, os mesmos foram acrescidos de 1:5 do volume de tampão de amostra (Glicerol a 50%; Azul de bromofenol a 0,20%; e solvente TBE a 2,5 X) e fracionados em gel de agarose de 1 a 0,7% em tampão TBE 1X (216 g de Tris-base; 110 g de ácido bórico; 80 ml de EDTA (0,5 M; pH 8,0); completar com H₂O para 4 L; ajustar o pH 8,0 - 8,5) contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). As corridas foram realizadas a 100 V durante um período de tempo relativo à dimensão do gel. O DNA foi visualizado e o gel fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta (320 nm) através do sistema de documentação fotográfica Multidoc-it Digital Imaging System (UVP). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de peso molecular usado, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

IV.6. Construção de uma linhagem de *C. pseudotuberculosis oppD* mutante.

Para a construção da linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* com a interrupção do gene *oppD* por meio do evento de recombinação homóloga simples (figura 5) foi utilizado um clone de uma biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis*, construída por D´Afonseca e cols. (2010) que continha um fragmento da ORF do gene *oppD* clonado. A biblioteca genômica em questão contém fragmentos do DNA cromossômico de *C. pseudotuberculosis* clonados no vetor pCR®-4Blunt -TOPO shotgun (Invitrogen) já estocados em *E. coli* DH5α. A confirmação de qual porção do gene *oppD* estava clonado no plasmídeo se deu pelo sequenciamento do fragmento e posterior alinhamento da sequência obtida com o genoma de *C. pseudotuberculosis*. Esta busca foi realizada através do programa Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>).

Após a identificação do clone de *E. coli*, na biblioteca genômica, que continha o fragmento da ORF *oppD* clonado no pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) partiu-se então para a extração do DNA plasmidiano utilizando as recomendações do kit Wizard[®] Plus Maxipreps DNA Purification System gene (Promega[®]). O plasmídeo extraído foi diretamente transformado (ver item IV.6.1.2) na linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* para gerar a linhagem mutante através de um evento de recombinação homóloga simples. A seleção dos clones mutantes para o gene *oppD* foi realizada em meio BHI contendo o antibiótico canamicina a 50 µg/mL.

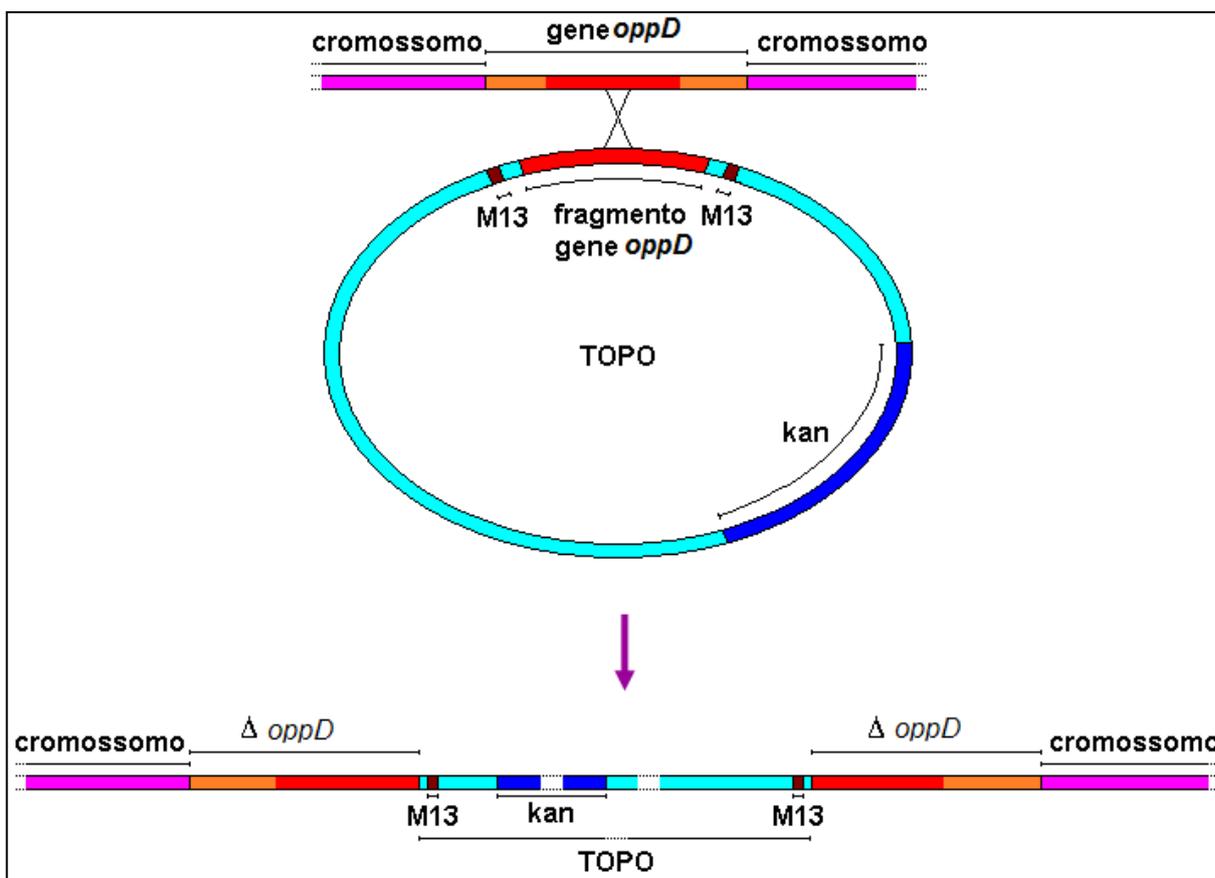


Figura 5. Representação esquemática do evento de recombinação homóloga simples entre o plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) contendo o fragmento da ORF *oppD* e o gene *oppD* presente no cromossomo de *C. pseudotuberculosis*. Adaptado Domingueti, 2011

IV.6.1. Transformação bacteriana

IV.6.1.1. Preparo de *C. pseudotuberculosis* eletrocompetente

O preparo de *C. pseudotuberculosis* eletrocompetente foi de acordo com Dorella e cols. (2006d.) Resumidamente, uma colônia de *C. pseudotuberculosis* 1002 crescida *overnight* (O.N) foi diluída em meio BHI (1:50) e incubada a 37°C durante 72 horas sob agitação até atingir uma absorbância (OD_{600nm}) entre 1,0 e 1,5. Uma vez alcançado este

valor, a cultura foi centrifugada a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 40 mL de uma solução de glicerol 10% gelada e estéril; este processo foi repetido 4 vezes. Após a última lavagem, as bactérias foram ressuspensas em 1 mL da solução de glicerol 10%. Esse 1 mL foi dividido em alíquotas de 100 µL que foram estocadas à - 70°C.

IV.6.1.2. Transformação de *C. pseudotuberculosis*

O vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] contendo o fragmento da ORF *oppD* clonado foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *C. pseudotuberculosis* preparadas de acordo com o protocolo descrito no item IV.6.1.1. A transformação foi conduzida por eletroporação seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente por Dorella e cols. (2006d). Imediatamente após o pulso, foi adicionado a cada cubeta 1,5 mL de meio BHI para ressuspensão das células e estas foram incubadas a 37° C por duas horas. O processo de seleção dos transformantes consistiu em transferir uma alíquota de 100 µL da suspensão de células eletroporadas, com o plasmídeo, para placas de Petri contendo meio BHI ágar suplementado com 50 µg/mL de canamicina. As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 48 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias recombinantes.

IV.7. Confirmação do mutante $\Delta oppD$

IV.7.1. Extração do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*

A única colônia transformante obtida foi inoculada em 30 mL de meio BHI suplementado com 50 µg/mL de canamicina. A cultura foi mantida a 37°C por aproximadamente 72 horas sob agitação. A cultura foi estocada em glicerol (1 mL da cultura + 1 mL de glicerol 80%) e armazenada a -80° C. Em seguida, foi realizada a extração do genômico de *C. pseudotuberculosis* de acordo com o seguinte protocolo: A bactéria mutante foi inoculada em 20 mL em meio BHI durante 72 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, centrifugada a 5.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspense em 1 mL da solução I (item IV.2). Depois de homogeneizada, a suspensão foi novamente centrifugada, desta vez, a 13.000 rpm, por 10 min., à temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado e 1 mL de solução II (item IV.2) foi adicionado. Após ressuspender o precipitado, a amostra foi incubada em banho-maria por 30 min. a 37°C. Foram adicionados 30 µL de sarcosil 30%; a amostra foi

homogeneizada por 15 min. e então deixada em banho-maria a 65°C por 5 min., seguido por incubação a 4°C por 5 min. Para purificação do DNA extraído, foi utilizado um protocolo padrão de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989). Em resumo, 1 mL da solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (item IV.2) foi adicionado à amostra. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 7 min. A fase superior da amostra foi retirada e transferida para um novo tubo tipo *eppendorf* de 2 mL. Esse processo foi repetido mais uma vez e em seguida adicionou-se 2,5 vol. de álcool etílico, NaOAc (3M) e glicogênio (20mg/mL) numa quantidade equivalente a 10% e 1%, respectivamente, do sobrenadante. O DNA foi precipitado O.N. a -20°C. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 min., o DNA foi lavado com álcool etílico a 70% e ressuspensão em água ultra pura

IV.7.2. Confirmação do evento de recombinação homóloga simples por PCRs

Para a confirmação da inativação do *oppD* pela inserção do vetor suicida através do evento de recombinação homóloga simples, foram realizados diversos ensaios de PCRs utilizando iniciadores que se anelam tanto em regiões do vetor inserido quanto em regiões do DNA cromossômico de *C. pseudotuberculosis*. Para amplificação de toda a construção foram utilizados iniciadores que se anelam nos sítios de iniciação e parada de tradução da ORF *oppD* uma vez que esses sítios de anelamento flanqueiam toda a inserção. Para amplificação de fragmentos contendo tanto regiões do genoma quanto regiões do vetor foram utilizados os iniciadores citados acima e os iniciadores com sítios de anelamento no vetor, como M13 e Canamicina (Km). As sequências nucleotídicas dos iniciadores, bem como a combinação dos mesmos, estão nas tabelas 4 e 5, respectivamente. As reações foram efetuadas da seguinte maneira: para amplificações de fragmentos de no máximo 2000pb, utilizou-se 1 pmoles/ μ L de cada iniciador; 0,25 mM de dNTPs; 0,1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2mM de $MgCl_2$, tampão da enzima 1X concentrado (Invitrogen) e 50 ng do DNA genômico extraído, para um volume final de 50 μ L. A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 95°C durante 4 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos; A temperatura de anelamento foi variável dependendo da combinação de primers, durante 30 segundos; extensão a 72°C durante 5 minutos; e extensão final por 8 minutos a 72°C. Para amplificação de fragmentos com tamanho superior à 2000pb foi utilizado uma *Taq* DNA polimerase Long-Range (Quiagen). Após a reação, todo o volume da mesma foi aplicado em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética realizada sob as mesmas condições descritas no item IV.5.

TABELA 4. Iniciadores usados na confirmação do mutante.

| Iniciadores | Sequências |
|--------------------------|---------------------------------|
| <i>oppDF</i> (senso) | 5'- ATGACTAACCCTGTCCTTAG -3' |
| <i>oppDR</i> (antisenso) | 5'- TTAATTGAGAGGGGTACCCG -3' |
| <i>KmF</i> (senso) | 5'-ATGATTGAACAAGATGGATTG-3' |
| <i>KmR</i> (antisenso) | 5'- TTA ATA ATTCAG AAGAAC TC-3' |
| <i>M13F</i> (senso) | 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' |
| <i>M13R</i> (antisenso) | 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' |

TABELA 5. Combinação dos iniciadores usados nas reações de PCRs para a confirmação do mutante em *oppD*.

| Iniciadores | Amostra de DNA | T _m (°C) | Taq DNA polymerase |
|-----------------------------|--|---------------------|--------------------|
| <i>oppDF</i> e <i>oppDR</i> | 1002wt | 60 | Long Range |
| <i>oppDF</i> e <i>oppDR</i> | 1002Δ <i>oppD</i> | 60 | Long Range |
| <i>KmF</i> e <i>KmR</i> | pCR [®] 2.1-TOPO [®] :OppD | 58 | Comum |
| <i>KmF</i> e <i>KmR</i> | 1002Δ <i>oppD</i> | 58 | Comum |
| <i>KmF</i> e <i>KmR</i> | 1002wt | 58 | Comum |
| <i>oppDR</i> e <i>KmR</i> | 1002wt | 58 | Comum |
| <i>oppDR</i> e <i>KmR</i> | 1002Δ <i>oppD</i> | 58 | Comum |
| <i>oppDF</i> e <i>KmF</i> | 1002wt | 58 | Comum |
| <i>oppDF</i> e <i>KmF</i> | 1002Δ <i>oppD</i> | 58 | Long Range |
| <i>M13F</i> e <i>oppDR</i> | 1002wt | 58 | Comum |
| <i>M13F</i> e <i>oppDR</i> | 1002Δ <i>oppD</i> | 58 | Comum |
| <i>M13R</i> e <i>oppDF</i> | 1002wt | 58 | Comum |
| <i>M13R</i> e <i>oppDF</i> | 1002Δ <i>oppD</i> | 58 | Comum |

IV.8. Identificação e caracterização do operon *opp* em *C. pseudotuberculosis*.

Paralelamente à confecção da linhagem mutante $\Delta oppD$ estava sendo anotado o genoma de *C. pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais e Rede Paraense de Genômica e Proteômica. Findo o processo de anotação, foi possível analisar o conteúdo gênico do operon *opp*, sua organização, similaridade com outras bactérias e quais os domínios protéicos conservados presentes nas subunidades protéicas pertencentes ao transportador.

IV.8.1. Análise do operon *opp* no genoma de *C. pseudotuberculosis*.

Para analisar o conteúdo e a disposição dos genes no operon foi utilizado o programa Artemis, disponível para download em (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>). Esse programa é um algoritmo desenvolvido para visualização de genomas e realização da anotação e curadoria manual. O Artemis permite a visualização de diversas características das sequências genômicas, como: produto codificado pelo gene predito; busca por similaridade protéica e nucleotídica em bancos de dados biológicos; visualização de prováveis domínios e famílias protéicas conservadas; visualização de conteúdo G+C, entre diversas outras funções (Rutherford *et al.*, 2000).

IV.8.2. Análise de similaridade

A análise de similaridade dos genes contidos no operon foi efetuada utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) na categoria BLASTp . Apenas o melhor alinhamento (*Best hit*) foi utilizado para comparação.

IV.8.3. Análise dos domínios protéicos

Os domínios protéicos conservados, presentes nas proteínas integrantes do transportador foram analisados através do programa Conserved domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) o qual reúne informações de diversos bancos de dados protéicos como (Pfam, SMART, COG, PRK, TIGRFAM).

IV.8.4. Confirmação *in-silico* do operon

Com o intuito de verificar se todos os genes codificadores das subunidades protéicas do transportador *Opp* são transcritos juntos em um RNA policistrônico, realizou-se a análise

da sequência de DNA de todos os genes junto com uma região de 1500 pb à montante do início da primeira ORF do operon. Essa análise foi feita utilizando a ferramenta de bioinformática SoftBerry – FGENESB, um preditor *in-silico* de genes e operons bacterianos.

IV.9. Padronização de um teste fenotípico para confirmar a perda da função da linhagem mutante $\Delta oppD$ de *C. pseudotuberculosis* na internalização de peptídeos

Com o objetivo de desenvolver um teste fenotípico que seja capaz de demonstrar a perda da função da linhagem mutante $\Delta oppD$ de *C. pseudotuberculosis* na internalização de peptídeos confeccionou-se curvas de sobrevivência comparando as taxas de crescimento das linhagens selvagem e mutante na presença do peptídeo tóxico GSH.

IV.9.1. Curvas de crescimento das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem e mutante $\Delta oppD$ na presença do tripeptídeo tóxico glutatona (GSH)

Foram preparados pré-inóculos da linhagem 1002 selvagem e da linhagem mutante $\Delta oppD$ de *C. pseudotuberculosis* em 20 mL de meio BHI acrescido de Tween[®] 80% (Item IV.3). Após 24 horas de crescimento a 37°C, parte dos cultivos foram re-inoculados (1:100) em 120 mL de meio BHI acrescido de Tween[®] 80%, e incubados a 37°C até atingirem o início da fase exponencial do crescimento ($DO_{600nm} = \sim 0,2$). Foi acrescentada canamicinana concentração de 50 µg/mL ao meio BHI para o cultivo da linhagem mutante.

Quando foi atingida a $DO_{600nm} = \sim 0,2$, as culturas de ambas as linhagens foram divididas em quatro alíquotas de 30 mL e o GSH foi adicionado a duas delas. As alíquotas que não receberam nenhum tratamento consistiam nas condições controle (figura 6). Foram testadas duas concentrações de GSH; 5mM e 10 mM; baseadas no trabalho de Green e cols. (2000). O monitoramento das curvas de crescimento seguiu por meio de leituras de DO_{600nm} para os tempos 0, 15, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a adição do substrato tóxico às culturas. Os experimentos foram realizados em triplicata para ambas as concentrações de GSH e para ambas as linhagens

A partir dos dados de DO_{600nm} , foram plotadas curvas de crescimento comparando as linhagens selvagem e mutante na presença e ausência do substrato tóxico GSH. Os dados de DO_{600nm} , foram processados e representados com auxílio do *software* GraphPad Prism v.5.0.

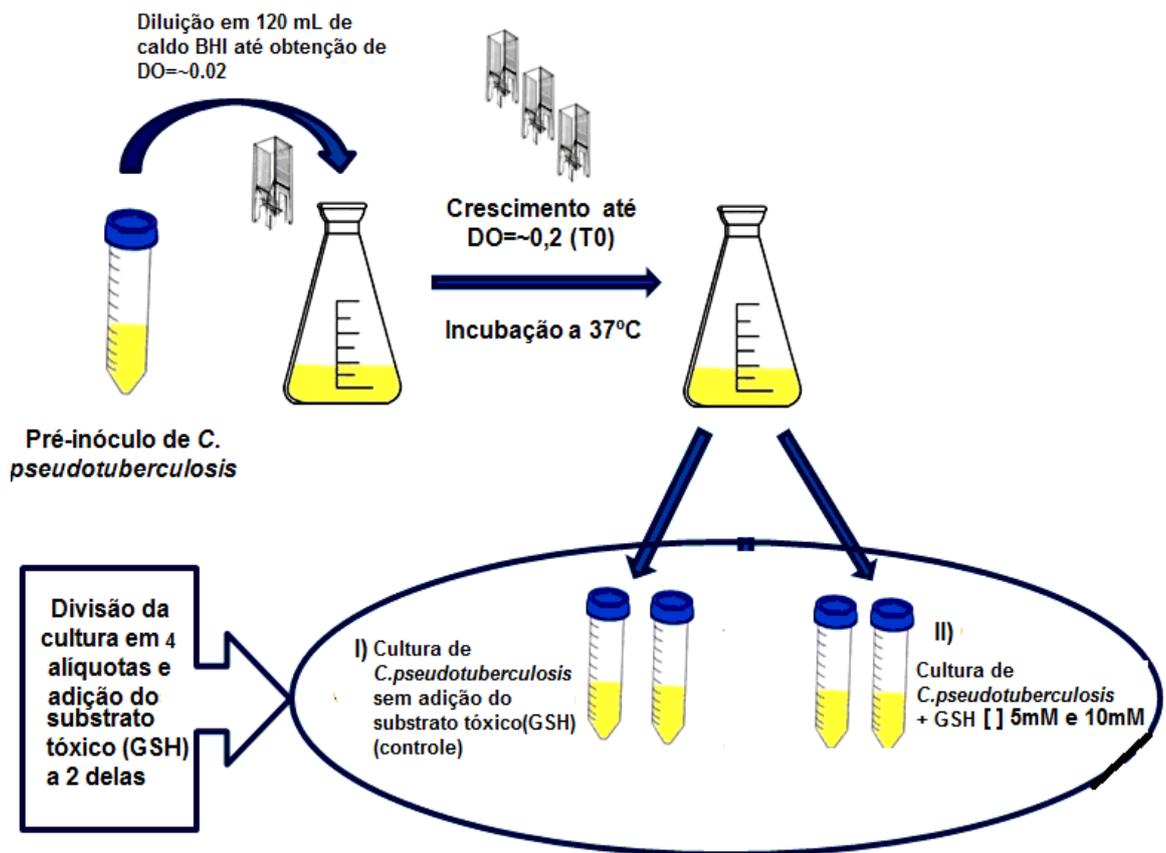


Figura 6. Representação esquemática do procedimento utilizado para confecção das curvas de crescimento das linhagens selvagem e $\Delta oppD$ mutante de *C. pseudotuberculosis* na presença e ausência do substrato tóxico GSH. Após a diluição do pré-inóculo (1:100), a DO_{600nm} da cultura foi regularmente monitorada em espectrofotômetro até atingir ~0,2. Este momento foi considerado o tempo inicial (T0) da curva, quando houve a divisão da cultura em 4 alíquotas e o substrato tóxico GSH foi adicionado a duas alíquotas, permanecendo as outras duas sem adição do substrato (controle). Esse procedimento foi realizado para ambas as linhagens. **Adaptado:** Castro, 2009

IV.10 Comparação do perfil de expressão de proteínas secretadas entre as linhas linhagens selvagem (wt) e mutante ($\Delta oppD$)

Existem relatos que apontam que os transportadores de peptídeos Opp participam na regulação de diversos processos celulares que são controlados via peptídeos sinalizadores (Coulter *et al.*, 1998; Samen *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2001). Deste modo, esperava-se que com a inativação do transportador, houvesse uma diferença no padrão de expressão gênica entre as linhagens selvagem e mutante. Com o objetivo de avaliar se a inativação do gene *oppD* acarretou em uma mudança no perfil de expressão gênica da linhagem mutante foi feita a comparação do perfil de expressão de proteínas secretadas entre a linhagem selvagem e $\Delta oppD$ mutante. Os estudos comparativos foram feitos através

de análises quantitativas utilizando eletroforese bidimensional (2-DE) (em triplicata para ambas as linhagens) seguindo os seguintes métodos;

IV.10.1 Extração das proteínas extracelulares

Para obter as proteínas secretadas foi utilizada a técnica de partição em três fases de acordo com Paule e cols. (2004), como descrito a seguir: após o cultivo ($DO_{600nm}=2.0$) as culturas foram distribuídas em tubos tipo *Falcon* e centrifugadas por 20 min. a 4.000g e os sobrenadantes foram filtrados em filtros de membrana 0,22 μm . Posteriormente foi adicionado sulfato de amônio na concentração de 30% (p/v), o pH da mistura foi ajustado para 4.0 e *n*-butanol adicionado no mesmo volume do sobrenadante. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora e centrifugada posteriormente a 2000g por 10 min. para que ocorresse a separação em três fases. A precipitação interfacial foi coletada e dissolvida em 1 mL de Tris 20 mM (pH 7.4) acrescido de 10 μ L de coquetel inibidor de proteases (concentração 100x) (GE Healthcare). O extrato protéico obtido foi dialisado por 48 horas contra água Milli - Q utilizando uma membrana de diálise com fator de exclusão de 12 kDa. A concentração protéica foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

IV.10.2 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Esta etapa foi realizada utilizando géis com gradiente de pH imobilizados sobre *strips* Tiras Immobiline (GE Helthcare) de tamanho constante 18cm, com intervalo de pH determinado não linear 3-10. 230 μ g de proteínas foram ressuspendidas em tampão de reidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, CHAPS 2%, Tris-HCL 40 mM, azul de bromofenol 0,002%, DTT 75 mM, IPG Buffer 1%). A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada utilizando-se o aparelho IPGphor 3 (GE Helthcare), sob a seguinte voltagem 100V 1hr, 500V 2hr, 1.000V 2hr, 10.000V 3hr, 10.000V 60.000Vhr, 500V 4 hr. Após a IEF as tiras foram equilibradas por 15 min. em 10 mL de solução (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) contendo o agente redutor DTT (100mg/10mL) e posteriormente com o agente alquilante iodoacetamida (250mg/10mL). A segunda dimensão foi feita utilizando gel de poliacrilamida 12%, em sistema vertical DaltSix (GE Healthcare).

IV.10.3 Coloração por Coomassie coloidal

Os géis foram corados por Coomassie coloidal G-250, como descrito a seguir: o gel foi fixado em solução contendo metanol 30%, ácido fosfórico 2%, por 24h. Posteriormente

utilizou-se solução contendo 2% ácido fosfórico para lavar os géis que em seguida foram incubados em solução contendo 2% de ácido fosfórico, 18% de metanol e 15% de sulfato de amônio por 30 min. Após este período foi acrescentado 5 mL de solução de *Coomassie Blue* G-250 (1%), permanecendo imerso nesta solução sob leve agitação por 48 h.

IV.10.4 Digitalização e análise das imagens

Depois de corados os géis foram digitalizados no *scanner Ettan DIGE Imager* (GE-Healthcare). As imagens foram analisadas com o programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE-Healthcare). O teste ANOVA foi adotado para avaliar as diferenças significativas dos *spots* entre as amostras ($p < 0,05$).

IV.11. Estudo do papel do transportador de peptídeos Opp na virulência e patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*

Com o intuito de avaliar se o transportador Opp de *C. pseudotuberculosis* está relacionado à virulência e patogenicidade dessa bactéria foram realizados testes comparando a persistência da infecção em modelo murino; a adesão e viabilidade da bactéria em macrófagos; e a capacidade de causar morte e lesão em camundongos entre a linhagem $\Delta oppD$ mutante e a linhagem selvagem.

IV.11.1. Comparação da viabilidade, em macrófagos murinos J774, de *C. pseudotuberculosis* selvagem e mutante

Sendo *C. pseudotuberculosis* um patógeno intracelular, ele tem a capacidade de aderir à parede celular do hospedeiro, se internalizar e sobreviver dentro desse meio causando a enfermidade. Deste modo, com o intuito de verificar se o transportador Opp possui algum papel nesse processo, estudamos o padrão de adesão da linhagem mutante comparada à linhagem parental 1002, bem como sua viabilidade no interior de macrófagos murinos J774. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a equipe do Dr. Raphael Hirata Jr, na UERJ.

IV.11.1.1. Preparação das monocamadas de células J774

A linhagem celular J774, originada de linfoma murino e diferenciada em macrófagos, foi cultivada em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com antimicrobianos (50µg/mL de gentamicina e 2,5µg/mL de fungizona) e 5% de Soro Fetal Bovino. As células foram mantidas sob temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂,

no interior de garrafas plásticas para a cultura de células (*Costar*). As monocamadas confluentes foram tripsinizadas em intervalos de dois dias, utilizando-se a solução isotônica (salina) contendo tripsina 0,2% (p/v) e EDTA 0,02% (p/v). Após aproximadamente três minutos de interação, a tripsina foi removida da garrafa e nova partida de meio DMEM completo foi adicionado à monocamada e agitada vigorosamente para que as células se soltassem do fundo da garrafa plástica. A suspensão foi contada em câmara de Neubauer e diluída de modo a conter em torno de 1×10^6 células/mL. Para os ensaios de aderência, 500 μ l a suspensão celular (em torno de 5×10^5 células/mL) foram distribuídos em microplacas de 24 poços. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 48 horas, até que a monocamada apresentasse acima de 95% de confluência.

IV.11.1.2. Ensaios da interação microbiana com células J774

As linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas em meio líquido BHI e incubadas por 24h a 37°C. Após três lavagens das amostras com solução salina tamponada de Dulbecco (PBS, 0,01M, pH 7.4, contendo 10mM de MgCl₂ e 10 mM CaCl₂) estéril, as linhagens foram ressuspensas em meio DMEM sem aditivos. As suspensões padrão bacterianas foram diluídas em meio DMEM de modo à obtenção de turvação bacteriana de 0.1 em comprimento de onda de 580 nm (cerca de 10^7 UFC/mL) em espectrofotômetro de tubos de vidro (Micronal 580D). A suspensão, foi em seguida, diluída 1:10 (em torno de 5×10^6 UFC/ml) em DMEM, para uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 bactérias por célula J774, em volume final de 500 μ L. Após interação por 1, 3 e 6 horas, alíquotas dos sobrenadantes foram removidas, diluídas e contadas para a determinação das UFC/mL. Logo após as monocamadas foram lavadas seis vezes com PBS-D (Item IV.2.) de forma branda, para que as células não se soltassem do fundo, e ressuspensas em 500 μ L tampão de lise [(PBS-D 0.1% de Triton X100 (BioRad))]. O lisado foi diluído para a contagem das UFC/mL e semeados em placas de BHI-ágar. O percentual de células aderidas foi determinado a partir do somatório das UFC no sobrenadante + UFC associadas às monocamadas (assumido como 100% dos microrganismos) de acordo com a seguinte fórmula: UFC associadas às monocamadas/ UFC no sobrenadante + UFC associadas às monocamadas X 100.

IV.11.1.3. Ensaios de viabilidade intracelular

Os ensaios de viabilidade intracelular foram realizados através da exclusão pela gentamicina. Após os tempos de incubação de 1, 3 e 6 horas, as monocamadas foram lavadas de forma branda por seis vezes, e nova partida de meio DMEM contendo 150 μ g de

gentamicina (Sigma) foi adicionada por uma hora. Controles da associação às monocamadas também foram realizados, da forma descrita anteriormente. Após três lavagens com PBS, as monocamadas foram lisadas com tampão de lise, diluídos em PBS e plaqueados em BHI-ágar, para a determinação das UFC. O percentual de microrganismos viáveis intracelulares foi determinado a partir do controle das bactérias associadas (sem a exposição à gentamicina).

IV.11.1.4. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média (\pm) desvio padrão. A significância da diferença entre os grupos foi calculada utilizando-se o teste ANOVA, seguido do teste “Turkey”, ambos disponíveis no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software). Um valor de $p < 0,05$ foi utilizado como limite da significância estatística.

IV.11.2. Ensaios de infecção e persistência com as linhagens de *C. pseudotuberculosis* selvagem e mutante $\Delta oppD$

Para avaliarmos se a inativação do *oppD* afetou a capacidade da linhagem mutante em causar morte e lesão em camundongos, bem como a persistência da infecção nesses animais foram feitas infecções experimentais das linhagens selvagem e mutante em modelo murino.

IV.11.2.1. Animais e parâmetros da infecção

Utilizou-se nos ensaios de infecção e persistência camundongos BALB/c com idades entre seis a oito semanas. Esta linhagem foi escolhida pela susceptibilidade a infecção à *C. pseudotuberculosis*. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Todos os procedimentos com estes animais foram realizadas segundo as normas do comitê de ética desta instituição de pesquisa (CETEA/UFMG).

A padronização de parâmetros tais como: cálculo da dose letal (LD50), volume das culturas a serem inoculados nos animais; via de inoculação mais adequada e intervalos entre as imunizações foram realizados anteriormente por Dorella, 2009.

IV.11.2.2. Infecção experimental dos camundongos e análises de virulência

Para os experimentos de avaliação da virulência através da infecção experimental, os camundongos foram divididos em três grupos, contendo 15 animais cada um. O primeiro grupo foi inoculado com solução salina 0,9% (controle negativo). O segundo grupo foi

infectado com a linhagem *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem, e o terceiro grupo com *C. pseudotuberculosis* mutante $\Delta oppD$. Todos os animais foram infectados pela via intraperitoneal, com um volume final de 100 μ L para cada dose. As inoculações com ambas as linhagens continham 10^6 UFC/mL. Os animais foram avaliados diariamente quanto à formação de abscessos no local da aplicação, nível de prostração e o número de óbitos foram contabilizados. Os camundongos que apresentaram sinais de morbidez, de médio a avançados, foram sacrificados por deslocamento cervical e também contabilizados como óbitos. As taxas de sobrevivência dos animais foram processados e representados com auxílio do *software* GraphPad Prism v.5.0 através do teste *Kaplan-Meier survival curve*.

Para os ensaios de persistência da infecção procedemos da mesma forma descrita anteriormente, com exceção da dose de inoculação que foi um pouco mais baixa que a anterior, (5×10^5 UFC/mL) para evitar que os animais fossem a óbito antes da conclusão do experimento. Durante os dias 1 a 5 pós-infecção, 3 animais de cada grupo foram sacrificados e tiveram seus baços extraídos e macerados em 2mL de salina 0.9%. Desse macerado foram plaqueadas as diluições 10^{-1} e 10^{-2} , em duplicata, em placas BHI para os camundongos infectados com a linhagem selvagem e BHI suplementado com canamicina (50 μ g/mL) para os animais infectados com a linhagem mutante. Os resultados da contagem de UFC de *C. pseudotuberculosis* contidas no baço foram processados e representados com auxílio do *software* GraphPad Prism v.5.0 através do teste *2way ANOVA*

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 Avaliação da utilização de um clone da biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis* para geração da linhagem $\Delta oppD$ mutante

Através do trabalho desenvolvido por D'Afonseca e cols. (2010), em que foi feita a caracterização parcial do genoma de *C. pseudotuberculosis* por meio do sequenciamento aleatório (GSS) de uma biblioteca genômica, foi possível identificar, em um dos clones pertencentes a essa biblioteca, um fragmento da ORF do gene *oppD* ligado ao plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®]. Com o intuito de avaliar se o plasmídeo em questão poderia ser utilizado para gerar uma linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis*, através do evento de recombinação homóloga simples, o fragmento foi sequenciado e comparado contra o genoma de *C. pseudotuberculosis* por meio da busca de similaridades.

A partir do sequenciamento foi obtida a sequência de todo o fragmento clonado que tinha aproximadamente 1200pb. As sequências geradas foram primeiramente unidas em um único *contig* utilizando o programa CAP3 e posteriormente comparada contra o genoma de *C. pseudotuberculosis*, que estava sob fase de anotação, utilizando o algoritmo BLASTn através do programa ARTEMIS. Com essas análises foi possível constatar que a sequência nucleotídica do fragmento de DNA cromossômico de *C. pseudotuberculosis* que estava ligado ao plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] em um dos clones da biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis* possuía uma similaridade de 100% com 1000pares de bases da ORF *oppD* (ver seção IV.1).

Como o plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO[®] não possui origem de replicação em *C. pseudotuberculosis* (plasmídeo suicida), e nele está clonado um fragmento de DNA de mil pares de bases que é homólogo à região central do gene *oppD* de *C. pseudotuberculosis*, é justificada a sua utilização como ferramenta para a geração de uma linhagem mutante para o gene *oppD* através do evento de recombinação homóloga simples

O nocaute gênico é uma boa estratégia para se estudar a função de determinados genes no organismo vivo. Diversas metodologias podem ser adotadas para esse processo de inativação em bactérias, sendo que uma das mais utilizadas é a inativação gênica via recombinação homóloga. Nesse processo um fragmento homólogo do gene que se deseja nocautear é ligado a um plasmídeo, que seja incapaz de se replicar no interior do organismo de interesse. Uma vez no interior da célula a única maneira do plasmídeo permanecer íntegro é a sua inserção no DNA cromossômico via mecanismo de recombinação homóloga, esse processo faz com que o plasmídeo se insira no interior do gene alvo tornando-o inativo (Kalogeraki., *et al* 1996). Nessa ocasião o vetor utilizado é denominado plasmídeo suicida.

V.2 Confeção e confirmação da linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* defectiva no transporte de peptídeos.

Foram feitas diversas tentativas de transformação até a obtenção da linhagem mutante, a qual foi confirmada fenotipicamente pelo crescimento em meio de cultura contendo o antibiótico canamicina, e molecularmente por PCRs utilizando diversas combinações de primers.

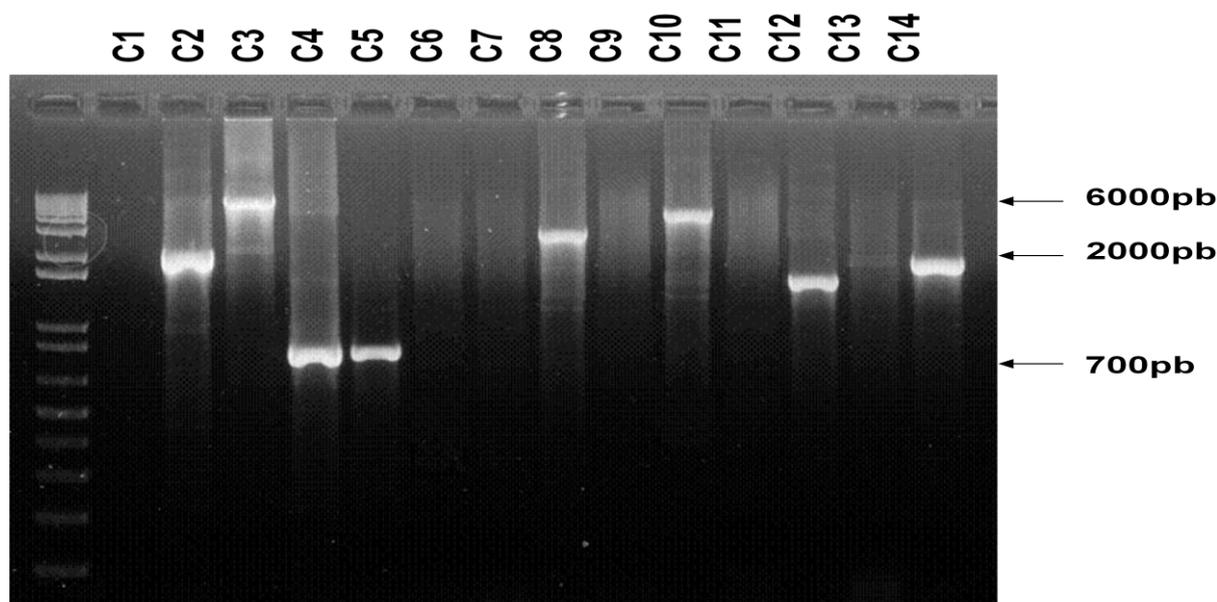


Figura 7. Gel de agarose 1% contendo o resultado da PCR efetuada para confirmação molecular da inserção do plasmídeo no interior do gene *oppD*

TABELA 6: Combinações de primers utilizados na PCR

| | PRIMER 1 | PRIMER 2 | Amostra de DNA | Tamanho do fragmento |
|-----|-------------------|--------------|----------------|------------------------|
| C1 | Controle negativo | | | |
| C2 | oppD foward | oppD reverse | 1002wt | 2000pb |
| C3 | oppD foward | oppD reverse | 1002ΔoppD - | 7000pb |
| C4 | Km foward | Km reverse | Topo PCR | 700pb |
| C5 | Km foward | Km reverse | 1002ΔoppD - | 700pb |
| C6 | Km foward | Km reverse | 1002wt | Não houve amplificação |
| C7 | oppD reverse | Km reverse | 1002Wt | Não houve amplificação |
| C8 | oppD reverse | Km reverse | 1002ΔoppD - | 3200pb |
| C9 | oppD foward | Km foward | 1002Wt | Não houve amplificação |
| C10 | oppD foward | Km foward | 1002ΔoppD - | 2000pb |
| C11 | M13 foward | oppD reverse | 1002Wt | Não houve amplificação |
| C12 | M13 foward | oppD reverse | 1002ΔoppD - | 1650pb |
| C13 | M13 reverse | oppD foward | 1002wt | Não houve amplificação |
| C14 | M13 reverse | oppD foward | 1002ΔoppD - | 1800pb |

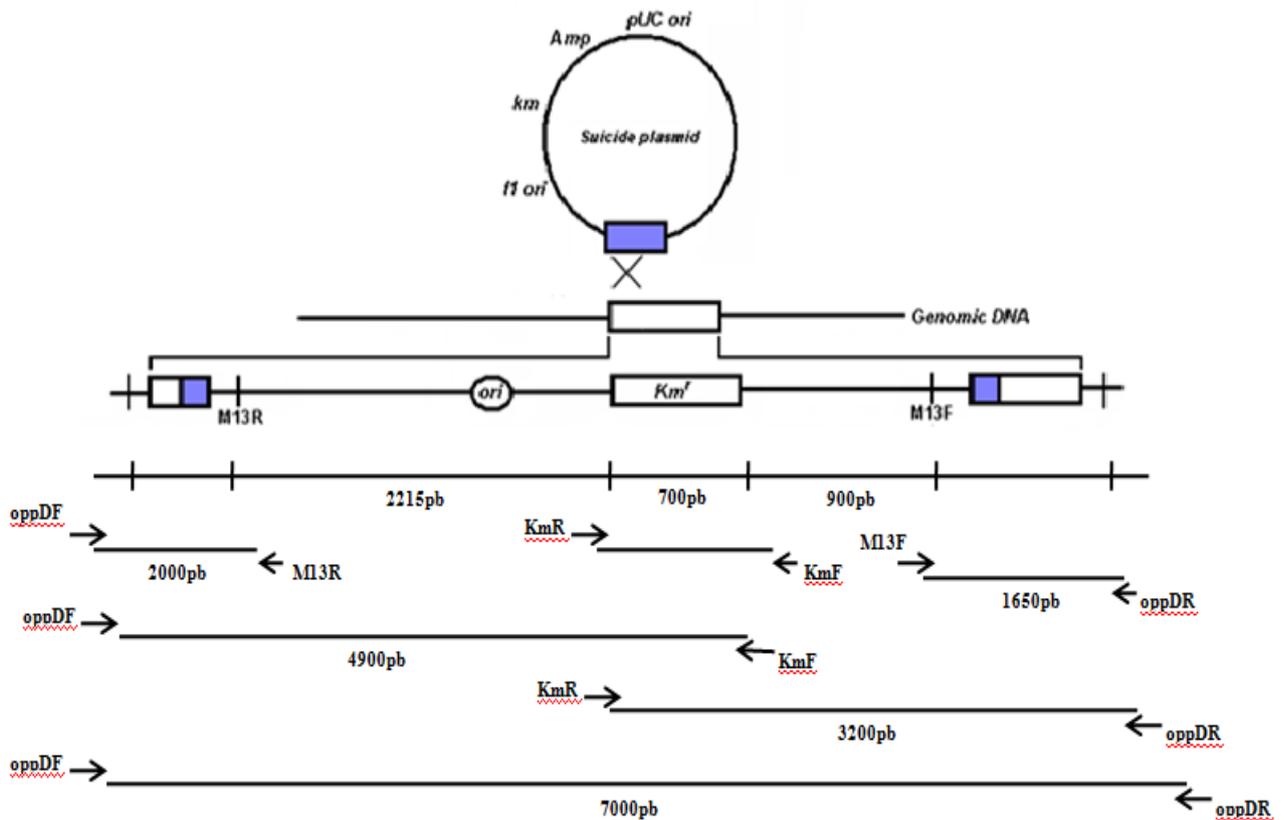


Figura 8. Representação esquemática da estrutura gênica após o evento de recombinação homóloga simples (interrupção do gene *oppD*), e os fragmentos gerados pela PCR.

O gel de agarose da figura 7 permite visualizar o resultado da PCR feita com o intuito de confirmar a inserção do plasmídeo no interior do gene *oppD*. Para isso foram utilizadas diversas combinações de iniciadores, sendo que para cada combinação foi feita uma reação controle com a linhagem selvagem (canaletas C2, C6, C7, C9, C11, C13). Sempre que um dos iniciadores utilizados na reação possuía seu sítio de anelamento contido no plasmídeo inserido, a amplificação só era possível quando a amostra de DNA era proveniente da linhagem mutante. Nas canaletas 2 e 3 observamos os fragmentos oriundos da amplificação utilizando iniciadores que se anelam no início e no fim da ORF *oppD*, regiões que flanqueiam a inserção. Quando a amostra de DNA era proveniente da linhagem selvagem, o fragmento obtido correspondia ao tamanho de toda a ORF do gene *oppD* (2000pb). Quando a amostra era da linhagem mutante, o fragmento correspondia ao tamanho da ORF completa, mais o plasmídeo inserido (5000pb), ou seja, aproximadamente 7000pb. Esse resultado nos deu a confirmação molecular que o vetor havia se inserido no interior de gene, tornando-o inativado.

Apesar de o internalizador de peptídeos Opp ser um complexo macromolecular formado pela união de várias subunidades protéicas e conseqüentemente vários genes

Observando a figura 9 podemos perceber que os genes codificadores das subunidades protéicas do transportador Opp estão orientados na direção contrária das ORFs que os flanqueiam, tal fato é um indicativo de que os genes são regulados independentemente, corroborando com a hipótese de que esses genes fazem parte de um operon (Green *et al.*, 2000). Outro fato relevante é que a disposição dos genes codificadores do transportador de peptídeos é incomum em *C. pseudotuberculosis*. O gene *oppA* que na maioria das espécies de bactérias é o primeiro do operon, em *C. pseudotuberculosis* foi translocado para o final. Essa mesma disposição é encontrada no *opp* de *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 10) (Green *et al.*, 2000)

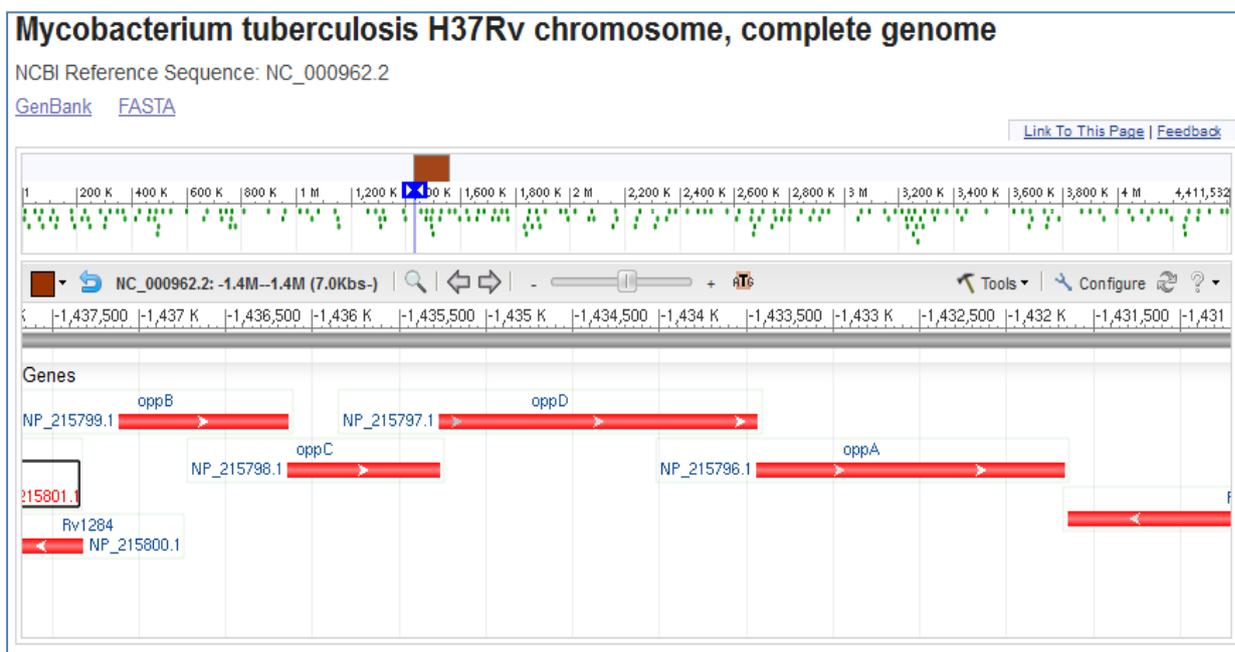


Figura 10. Representação do contexto genômico do operon *opp* em *M. tuberculosis* H37Rv. (*oppBCDA*).

Adaptado: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/57116681?report=graph>>. Último acesso: 06/02/2012.

A análise dos domínios protéicos presentes nas subunidades do transportador foram efetuadas através do programa *Conserved Domain* disponível no site do NCBI. Na sequência de aminoácidos do gene *oppA* foi encontrada similaridade com um domínio protéico extracelular de ligação a peptídeos, mostrando que essa subunidade está ligada à captura de peptídeos do meio extracitoplasmático e transferência desses peptídeos às proteínas formadoras do canal transmembrânico.

Nas sequências de aminoácidos dos genes *oppB* e *oppC* foi encontrado um domínio protéico conservado, relacionado à formação de canais de transporte através da membrana

plasmática. Tal fato indica que essas proteínas são as responsáveis pela formação do canal pelo qual os peptídeos são translocados através da membrana.

Na análise da sequência do gene *oppD* foram encontrados dois domínios protéicos relacionados à hidrólise de ATP (Figura 11). Esse resultado pode explicar a ausência do gene *oppF* no operon em *C. pseudotuberculosis*. A presença desses domínios na mesma proteína pode ser devido, provavelmente, a uma fusão entre os genes *oppD* e *oppF*. Essa mesma configuração foi encontrada em *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando que essa fusão pode ser uma característica das Actinobactérias (Braibant et al., 2000).

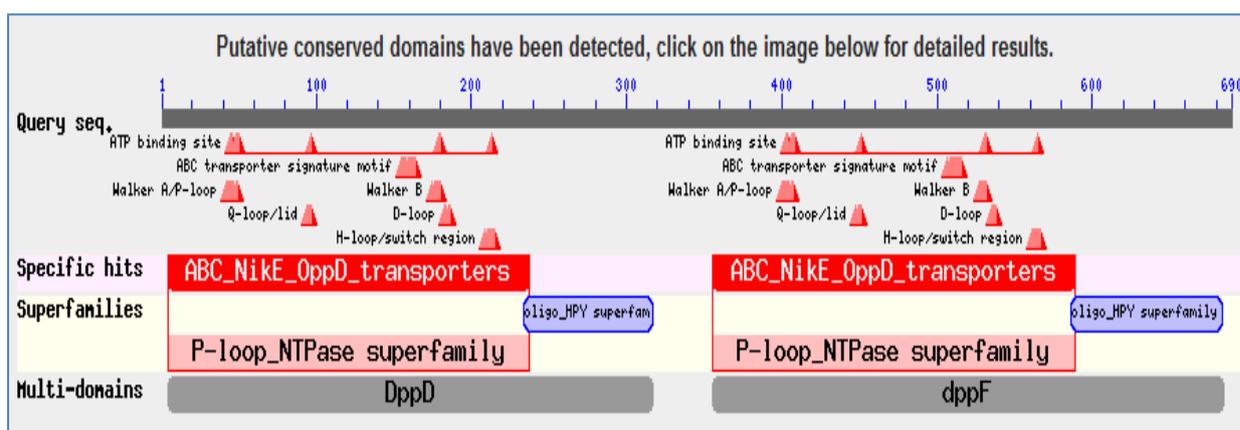


Figura 11. Resultado da busca por domínios protéicos conservados na sequência de aminoácidos do gene *oppD* de *C. pseudotuberculosis*. A figura mostra que o gene *oppD* possui dois domínios protéicos relacionados à hidrólise de ATP.

Adaptado: <[http://www. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)>. Último acesso: 06/02/2012.

V.3.1 Comparação das sequências nucleotídicas dos genes pertencentes ao operon opp entre as linhagens de *C. pseudotuberculosis* já sequenciadas

Em um trabalho de genômica comparativa, realizado pelo nosso grupo de pesquisa em parceria com outros colaboradores, diversas linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas de diferentes hospedeiros em várias partes do mundo (Tabela 7) tiveram seus genomas sequenciados, montados, anotados, e submetidos a uma posterior análise comparativa através de uma abordagem pangenômica (Silva et al., 2011). De posse desses genomas foi possível fazer a comparação das sequências nucleotídicas de todos os genes codificadores das subunidades protéicas do transportador de peptídeos Opp entre todos os isolados. Os resultados demonstraram que a sequência nucleotídica dos genes pertencentes ao operon *opp* são idênticas entre as linhagens de *C. pseudotuberculosis* sequenciadas. Tal fato nos mostra que o transportador Opp faz parte do genoma central (*core*) de *C. pseudotuberculosis*. Genoma central é um termo utilizado para designar genes que estão sujeitos a uma significativa pressão seletiva devido à função essencial que eles

exercem na biologia do organismo e por isso estão presentes nos genomas de todas as linhagens analisadas (Tettelin *et al.*, 2005; Muzzi *et al.*, 2007; Lapierre; Gogarten, 2009).

TABELA 7 – Locais de origem e hospedeiros das linhagens de *C. pseudotuberculosis* já sequenciadas

| ESPÉCIE | LINHAGEM | BIOVAR | HOSPEDEIRO | ORIGEM | REFERÊNCIA |
|------------------------------|----------|--------|------------|------------|-----------------------------------|
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | 1002 | ovis | Caprino | Brasil | Ruiz JC <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | C231 | ovis | Ovino | Austrália | Ruiz JC <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | I19 | ovis | Bovino | Israel | Silva A <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | FRC41 | ovis | Humano | França | Trost E <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | PAT10 | ovis | Ovino | Argentina | Cerdeira LT <i>et al.</i> , 2011a |
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | CIP52.97 | equi | Equino | Inglaterra | Cerdeira LT <i>et al.</i> , 2011b |
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | 162 | equi | Camlídeo | Quênia | Em publicação |
| <i>C. pseudotuberculosis</i> | 258 | equi | Equino | Inglaterra | Em publicação |

V.3.2 Confirmação *in-silico* do operon.

A análise das sequências dos genes codificadores das subunidades protéicas, integrantes do transportador de peptídeos Opp, através da ferramenta FGENESB disponível no site www.softberry.com demonstrou que eles fazem parte de um operon e que são transcritos em uma única unidade transcricional (Figura 12).

```

Prediction of potential genes in microbial genomes
Time: Tue Jan 1 00:00:00 2005
Seq name: test sequence
Length of sequence - 5826 bp
Number of predicted genes - 4
Number of transcription units - 1, operons - 1

```

| N | Tu/Op | Conserved pairs(N/Pv) | S | | Start | End | Score |
|---|-------|--------------------------|---|---|-------|--------|----------|
| 1 | 1 Op | 1 | . | + | CDS | 17 - | 1000 266 |
| 2 | 1 Op | 2 | . | + | CDS | 1002 - | 2042 335 |
| 3 | 1 Op | 3 | . | + | CDS | 2046 - | 4118 409 |
| 4 | 1 Op | 4 | . | + | CDS | 4143 - | 5825 842 |

Figura 12. Resultado da análise das sequências dos genes codificadores das subunidades protéicas pertencentes ao transportador Opp através da ferramenta FGENESB. Em torno do círculo vermelho está a indicação de que os genes são transcritos juntos, em uma única unidade transcricional.

V.4 Padronização de um teste fenotípico para confirmar a perda da função da linhagem mutante $\Delta oppD$ de *C. pseudotuberculosis* na internalização de peptídeos

Uma forma de caracterizar fenotipicamente linhagens mutantes defectivas no transporte de moléculas através da membrana plasmática é a utilização de substratos análogos que ao serem internalizados por esses transportadores apresentem toxicidade à bactéria. Essa metodologia é efetiva nesse tipo de análise, pois se espera que na linhagem mutante a ausência do transportador torne essa linhagem resistente aos efeitos do substrato tóxico uma vez que esse não será internalizado pela bactéria. Já na linhagem selvagem a presença do transportador funcional fará com que o substrato tóxico seja transportado para o interior da célula causando danos à bactéria.

Em um trabalho realizado por Green e cols. (2000), no qual foi gerada uma linhagem mutante de *M. bovis*, uma espécie bacteriana filogeneticamente próxima a *C. pseudotuberculosis* deficiente no transporte de peptídeos através da inativação do gene *oppD* utilizou-se o tripeptídeo glutathiona (GSH) como substrato tóxico para a caracterização fenotípica da linhagem mutante.

O GSH é um tripeptídeo formado pela união dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. Esse composto está presente nas células da maioria dos organismos vivos e acredita-se que ele funcione como um agente antioxidante protegendo as células dos efeitos danosos ocasionados pelos radicais livres do oxigênio (Seres *et al.*, 2000). Algumas espécies bacterianas pertencentes ao grupo das actinobactérias dentre as quais estão incluídas *M. bovis* e *C. pseudotuberculosis*, não sintetizam o GSH e utilizam outros compostos como agente antioxidante. A base da toxicidade do GSH contra *M. bovis* é desconhecida, mas acredita-se que a presença de altas concentrações desse tripeptídeo no citoplasma cause uma perturbação nas reações de oxi-redução ocasionando na morte celular (Green *et al.*, 2000).

A utilização do tripeptídeo glutathiona GSH como substrato tóxico se mostrou uma ferramenta eficiente na caracterização de linhagens mutantes para o transportador de peptídeos *Opp* em uma espécie de bactéria filogeneticamente próxima à *C. pseudotuberculosis*. Assim sendo resolvemos utilizar essa mesma molécula para caracterização fenotípica da linhagem mutante $\Delta oppD$ de *C. pseudotuberculosis*. Para isso foram feitas curvas de crescimento, através de leituras de densidade ótica (DO_{600nm}), das linhagens selvagem e mutante na presença e ausência do substrato tóxico GSH nas concentrações de 5mM e 10 mM conforme pode ser visualizado nos gráficos a seguir (Figuras 13 e 14).

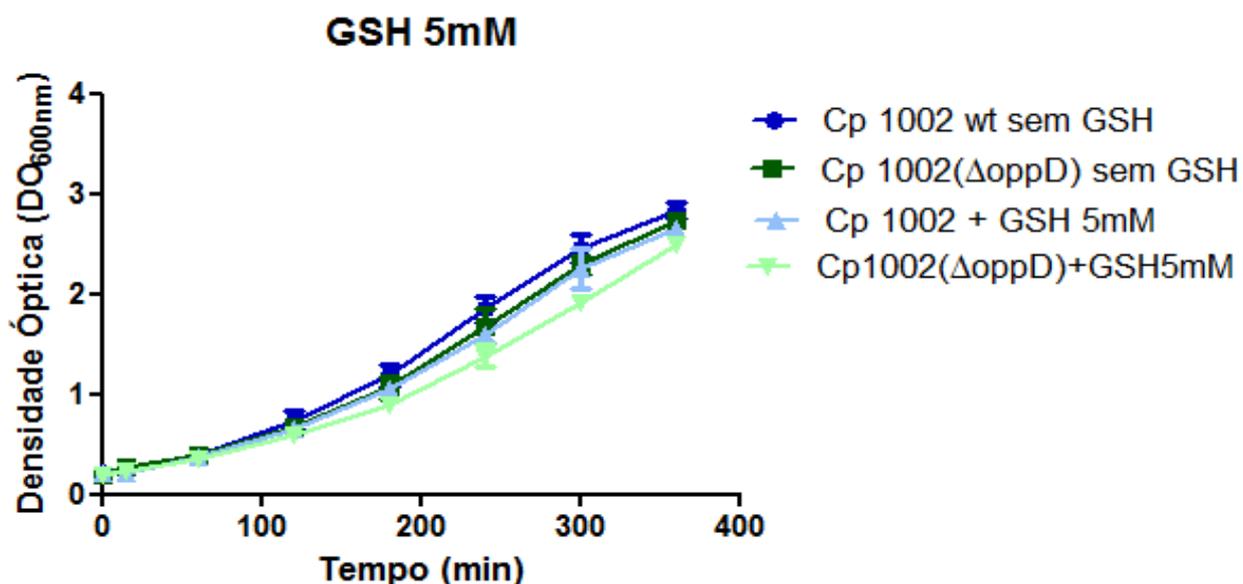


Figura 13. Curvas de crescimento ($DO_{600nm} \times$ Tempo) das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante $\Delta oppD$ na presença e ausência do tripeptídeo GSH 5mM .

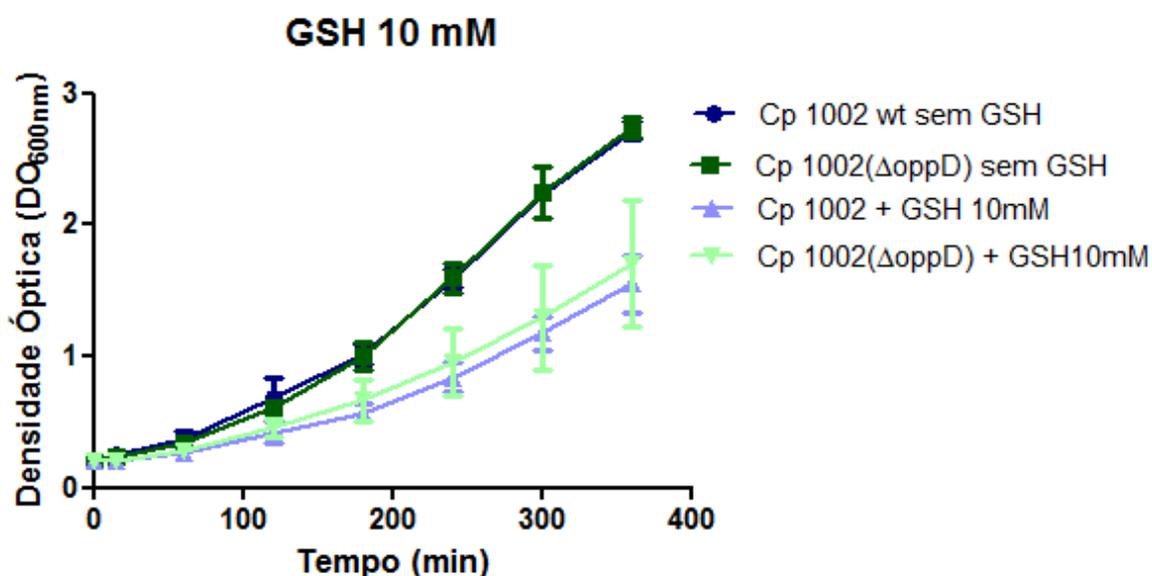


Figura 14. Curvas de crescimento ($DO_{600nm} \times$ Tempo) das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 selvagem (wt) e mutante $\Delta oppD$ na presença e ausência do tripeptídeo GSH 10mM

Diferente do trabalho realizado por Green e cols. (2000), com um mutante *oppD* de *Mycobacterium bovis*, em que a linhagem selvagem foi sensível a concentrações de 5mM de GSH, *C. pseudotuberculosis* mostrou-se resistente aos efeitos tóxicos do GSH nessa concentração uma vez que as linhagens selvagem e mutante apresentaram o mesmo perfil de crescimento na presença e ausência do substrato tóxico (figura 13). Com o intuito de encontrar uma concentração de GSH na qual *C. pseudotuberculosis* fosse sensível aos efeitos tóxicos desse substrato, foram testadas diversas concentrações de GSH (dados não mostrados) sendo escolhida a concentração de 10mM uma vez que concentrações acima desse valor inibem o crescimento de ambas as linhagens.

O gráfico da figura 14 mostra que apesar da glutatona ser tóxico à *C. pseudotuberculosis*, na concentração de 10 mM, a utilização desse substrato não foi capaz de distinguir fenotipicamente as linhagens selvagem e mutante uma vez que o crescimento de ambas foi igualmente afetado pela presença do GSH nessa concentração.

Foram levantadas duas hipóteses na tentativa de explicar os resultados obtidos: (i) O tripeptídeo GSH não necessita de ser transportado para o citoplasma de *C. pseudotuberculosis* para que seja tóxico a bactéria ou (ii) o tripeptídeo glutatona está sendo internalizado pela bactéria por uma via diferente do Opp. Ainda nos resta avaliar qual das duas hipóteses está realmente ocorrendo nos experimentos de curvas de crescimento na presença do GSH.

Análises fenotípicas de linhagens mutantes para transportadores de peptídeos normalmente são difíceis de serem feitas devido à presença na bactéria de mais de um transportador com sobreposição na especificidade dos substratos transportados (Green *et al.*, 2000). Uma ferramenta efetiva para esse tipo de análise, porém bem dispendiosa seria a utilização de uma combinação de diversos peptídeos marcados que variam no tamanho e na sequência de aminoácidos. Com esse tipo de abordagem seria possível saber quais as características dos peptídeos transportados pela bactéria, bem como a especificidade de cada transportador (Green *et al.*, 2000).

V.5 Comparação do perfil de proteínas secretadas entre as linhagens selvagem e mutante

Os transportadores de peptídeos presentes na membrana plasmática de bactérias Gram-positivas têm como principal papel a aquisição de peptídeos como fonte nutricional, no entanto, esses transportadores podem carrear a internalização de uma classe especial de peptídeos que funcionam como moléculas sinalizadoras (Lazazzera, 2001).

Há 32 anos foi descoberto por Neelson K.H e Hastings J.W que bactérias podem eventualmente se comportar como organismos multicelulares uma vez que através de um processo de comunicação intercelular via moléculas sinalizadoras, que em Gram-positivos são os peptídeos, as células bacterianas presentes na população podem integrar a resposta a determinados estímulos ambientais coordenando a expressão gênica em uma escala populacional. Diversos processos celulares bacterianos como produção de antibióticos, formação de biofilme, esporulação e virulência já foram descritos como sendo regulados via mecanismos de comunicação intercelular (Sturme *et al.*, 2002).

Para avaliarmos se o transportador de peptídeos Opp está relacionado indiretamente na regulação da expressão protéica de *C. pseudotuberculosis*, uma vez que ele pode ser utilizado para a captação de peptídeos sinalizadores, foi feita a comparação entre o perfil de proteínas secretadas das linhagens selvagem e $\Delta oppD$ mutante através de 2-DE.

A escolha das proteínas secretadas como método de avaliar a diferença no perfil de expressão gênica entre as duas linhagens trabalhadas se justifica pelo fato dessa classe de proteínas representarem uma fração importante dos determinantes moleculares de virulência de bactérias patogênicas, pois uma vez que essas colonizam células e tecidos do hospedeiro, as proteínas secretadas é que medeiam os processos de adesão, destruição tecidual e interferência com o sistema imunológico (Wooldridge *et al.*, 2009).

As culturas bacterianas das linhagens selvagem e mutante submetidas ao processo de extração de proteínas secretadas foram crescidas em meio quimicamente definido (MQD), uma vez que os meios de cultura atualmente utilizados para o cultivo de *C.pseudotuberculosis* como o BHI e triptose são ricos em proteínas exógenas e essas poderiam eventualmente contaminar a amostra protéica de interesse (Moura Costa *et al*, 2002). Além disso, as extrações foram realizadas durante a fase exponencial tardia do crescimento, pois o processo de comunicação celular (*quorum sensing*) cujo transportador Opp possa estar relacionado é dependente de uma alta densidade populacional.

Foram feitas 3 extrações protéicas para cada linhagem, as proteínas obtidas foram separadas de acordo com suas propriedades físico-químicas em 2 dimensões (ponto-isoeletrico e peso molecular). Após a separação do extrato protéico por 2-DE os géis foram digitalizados no *ImageScanner* (GE Healthcare), e as imagens obtidas analisadas pelo programa *ImageMaster 2D Platinum 7* seguindo os seguintes parâmetros: primeiramente os *spots* foram detectados automaticamente pelo programa seguido de uma análise manual para eliminar possíveis artefatos nas imagens, posteriormente os géis foram alinhados a partir dos *spots* que apresentaram reprodutibilidade. As réplicas biológicas foram comparadas através da igualdade dos *spots* em conjunto ou individualmente entre todos os

géis. Baseado nestes parâmetros foi possível detectar 67 *spots* na linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis* e 73 *spots* na linhagem $\Delta oppD$ mutante, sendo que desses *spots* 56 foram comuns entre ambas as linhagens, 11 exclusivos da linhagem selvagem e 17 exclusivos da linhagem mutante (Figuras 15 e 16).

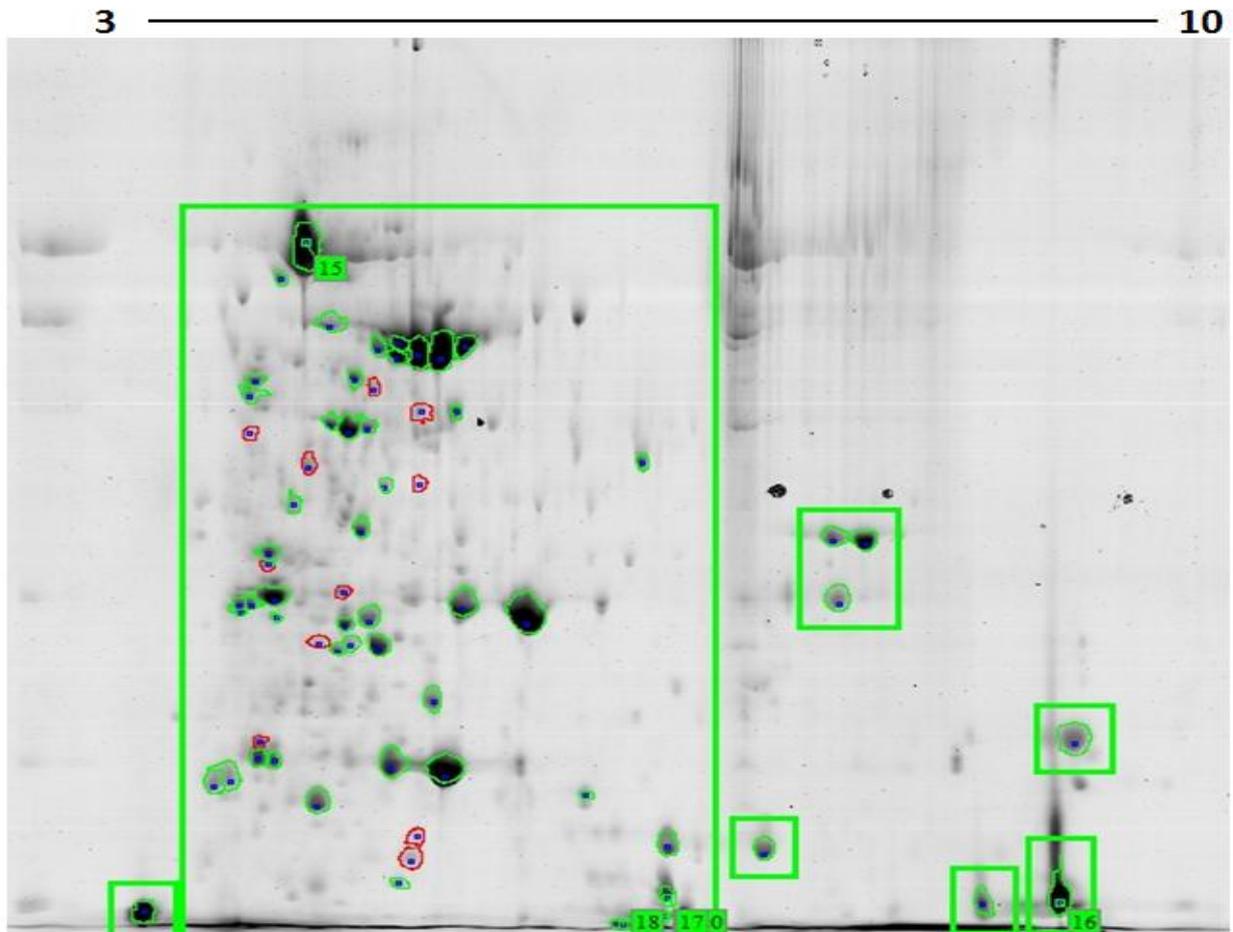


Figura 15. 2-DE das proteínas extracelulares da linhagem 1002 selvagem corado com *Coomassie*. Os spots marcados em verde indicam proteínas comuns entre as linhagens, e os marcados em vermelho proteínas tidas como exclusivas.

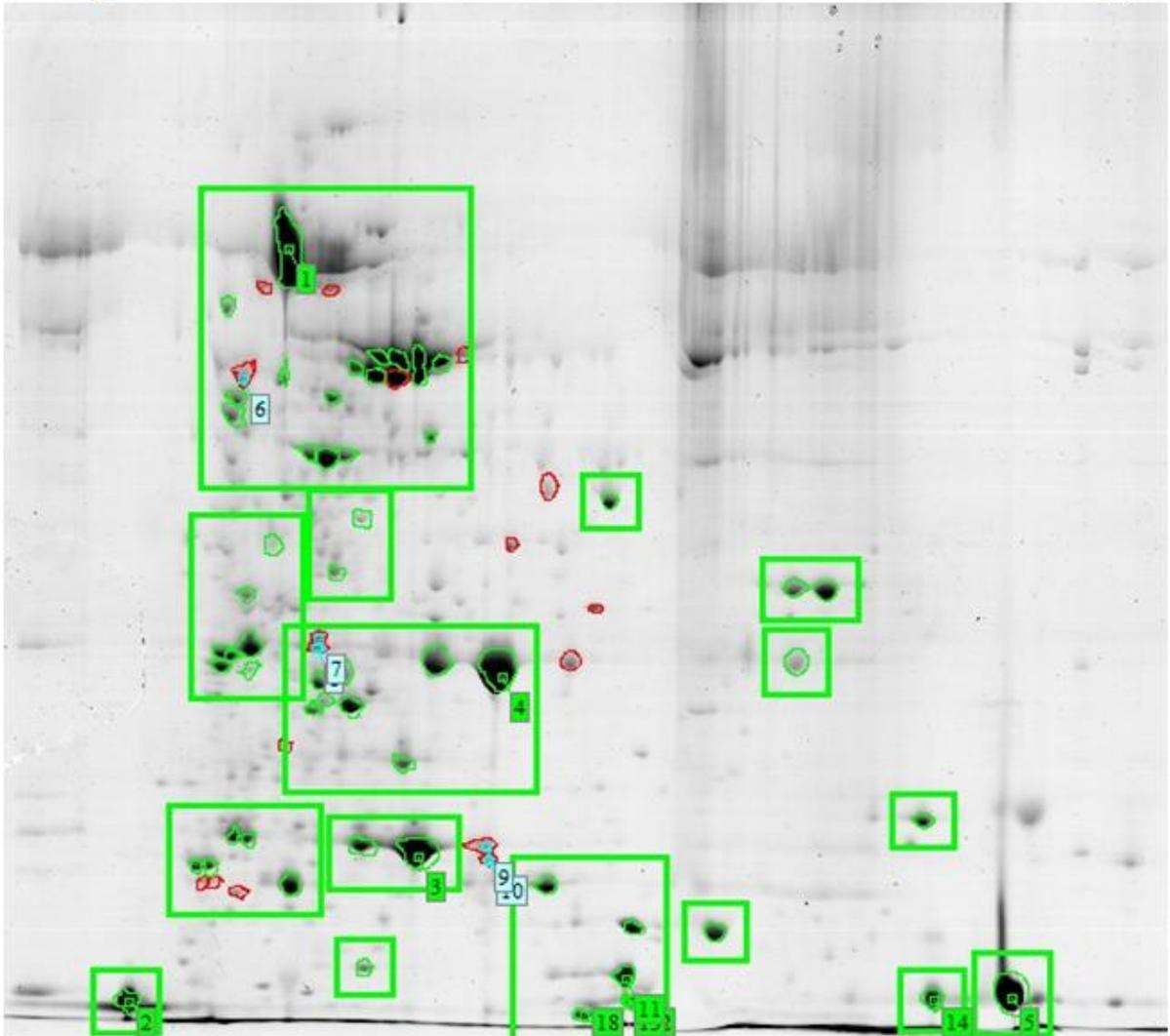


Figura 16. 2-DE das proteínas extracelulares da linhagem mutante $\Delta oppD$ corado com Coomassie. Os spots marcados em verde indicam proteínas comuns entre as linhagens, e os marcados em vermelho proteínas tidas como exclusivas

A análise dos géis demonstrou que a inativação do gene *oppD* na linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* acarretou em uma mudança no perfil de proteínas secretadas dessa linhagem em comparação com a linhagem selvagem. Essa ampla variação observada demonstra a possibilidade de o transportador Opp estar relacionado há um processo de controle da expressão gênica em *C. pseudotuberculosis*. Esse mesmo resultado foi observado por Flores-Valdez e colaboradores (2009), em um estudo com *M. tuberculosis* no qual foi avaliado através da técnica de microarranjo (*microarray*) o perfil de expressão gênica de uma linhagem mutante para o transportador de peptídeos Opp. Nesse trabalho foi

visto que o Opp modulava a expressão de diversos genes sendo que a maioria deles codifica proteínas expostas na superfície da bactéria (Flores-Valdez *et al.*, 2009).

Para que possamos avaliar quais proteínas foram diferencialmente expressas e posteriormente inferir a quais processos celulares elas podem estar relacionadas, será necessário o sequenciamento dos spots protéicos por espectrometria de massa.

V.6 Avaliação do papel do transportador de peptídeos Opp na virulência e patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*

Dentre os processos celulares que podem ser controlados via peptídeos sinalizadores está incluso o controle da expressão de genes relacionados à virulência (Lazazzera, 2001). Diversos trabalhos com bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* e *Mycobacterium sp.*, demonstraram que linhagens mutantes para o transportador de peptídeos Opp apresentaram uma redução na virulência. (Coulter *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2005; Sasseti *et al.*, 2003). Com o objetivo de verificar se o Opp de *C. pseudotuberculosis* está relacionado à virulência e patogenicidade dessa bactéria foram realizados testes comparando a adesão e viabilidade intracelular da bactéria em macrófagos; a persistência da infecção em modelo murino; e a capacidade de causar morte e lesão em camundongos entre a linhagem $\Delta oppD$ mutante e a linhagem selvagem.

V.6.1 Comparação da capacidade de infecção e adesão a macrófagos entre as linhagens mutante e selvagem

No curso da infecção por *C. pseudotuberculosis* é necessário que a bactéria seja capaz de aderir à parede das células fagocíticas do hospedeiro, internalizar-se e sobreviver dentro deste “ambiente” como um parasita intracelular. Deste modo, para avaliarmos se a inativação do gene *oppD* afetou a capacidade da linhagem mutante *C. pseudotuberculosis* em aderir e sobreviver no interior de macrófagos murinos foram feitos ensaios *in vitro* de adesão e viabilidade em células J774 de camundongos. Os gráficos abaixo mostram a comparação, entre as linhagens mutante e selvagem, do percentual de bactérias aderidas e viáveis no interior de macrófagos nos tempos 1, 3 e 6 horas.

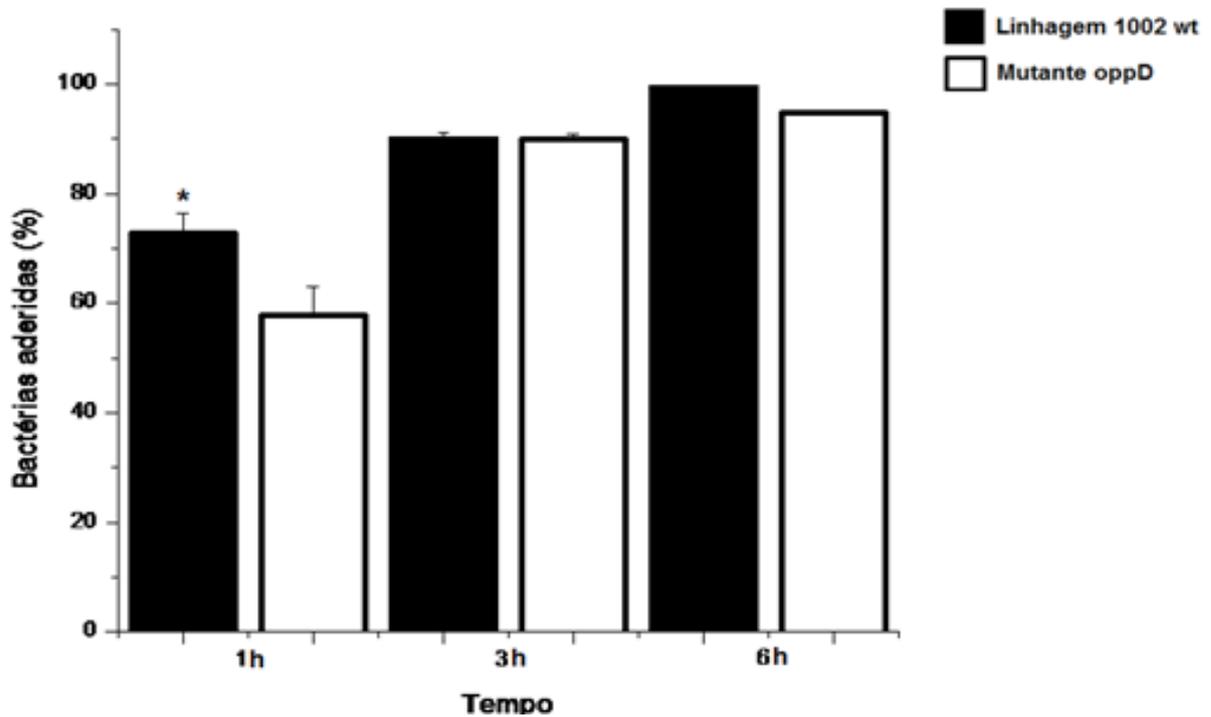


Figura 17. Gráfico dos padrões de bactérias aderidas das linhagens selvagem e mutante após 1, 3 e 6 horas com as monocamadas de células J774. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. * Significativo em relação aos demais grupos testatos ($p < 0,05$).

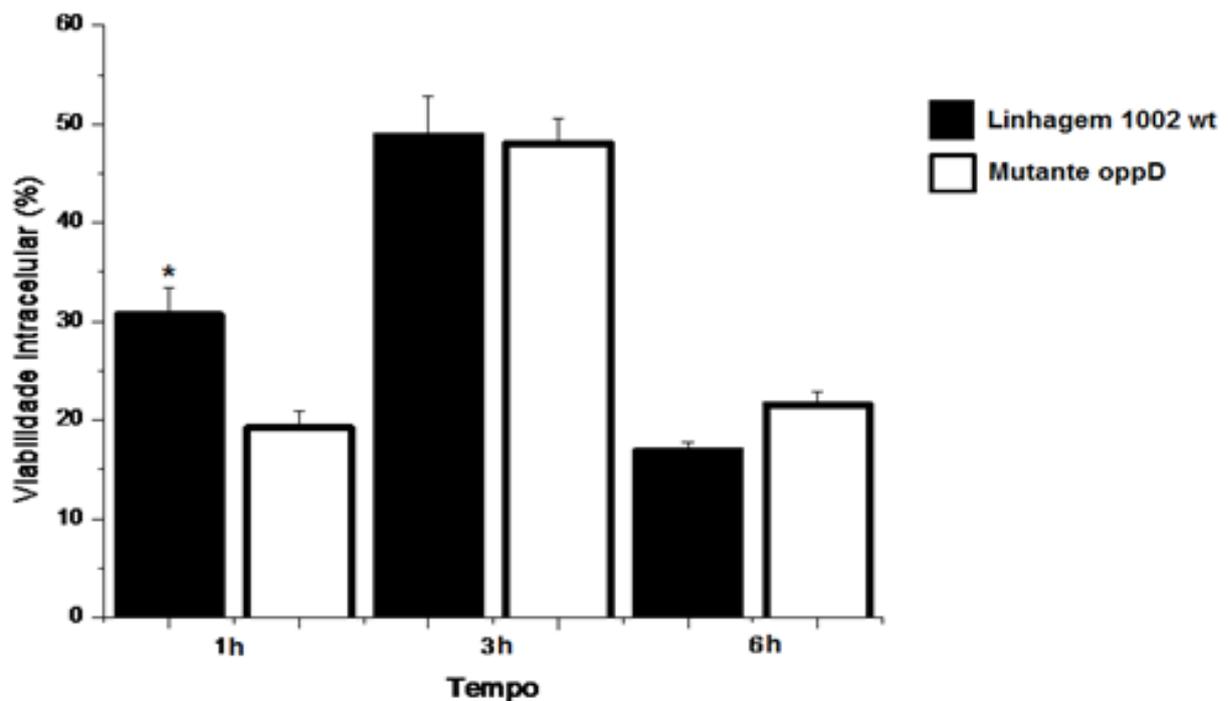


Figura 18. Gráfico dos percentuais de *C.pseudotuberculosis* selvagem e mutante viáveis no interior de macrófagos murinos J774 após 1, 3 e 6 horas. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. * Significativo em relação aos demais grupos testatos ($p < 0,05$).

Analisando os gráficos podemos perceber que houve uma redução estatisticamente significativa somente durante a primeira hora, e que nos tempos de 3 e 6 horas, ambas as linhagens apresentaram a mesma capacidade em aderir e infectar macrófagos.

Esse resultado demonstra que a linhagem $\Delta oppD$ mutante possui um atraso com relação à selvagem na capacidade de adesão à membrana celular dos macrófagos pois somente durante as fases iniciais do experimento é que a porcentagem de bactérias mutantes aderidas foi menor que as selvagens.

O menor potencial de adesão da linhagem mutante levou também a uma diminuição da sua capacidade de internalização (Figura 18) uma vez que para infectar a célula fagocítica é necessário que primeiramente a bactéria estabeleça um contato com a membrana do macrófago.

Trabalhos realizados com diferentes espécies do gênero *Streptococcus* demonstraram que linhagens mutantes para o transportador de peptídeos Opp apresentaram uma capacidade reduzida de aderir às células humanas (Cundell *et al.*, 1995; Darmstadt *et al.*, 2000). Essa redução em *Streptococcus pyogenes* foi ocasionada pela diminuição na expressão do gene *fbxA* que codifica uma adesina de ligação ao fibrinogênio (Samen *et al.*, 2004). Tal fato demonstra que o Opp pode estar relacionado ao controle da transcrição de genes relacionados à adesão bacteriana. Ainda nos resta avaliar se a mutação no transportador de peptídeos em *C. pseudotuberculosis* acarretou na alteração da expressão de alguma proteína relacionada à adesão celular.

V.6.2 Infecção de camundongos BALB/c com as linhagens selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*

Com o intuito de avaliar se a inativação do gene *oppD* em *C. pseudotuberculosis* acarretou em uma diminuição no perfil de virulência da linhagem mutante foram realizados ensaios de infecção utilizando camundongos BALB/c. Os animais foram divididos em três grupos; grupo controle - inoculado com solução salina 0.9%; grupo 1002 Wt - inoculado com 10^6 UFC da linhagem selvagem e grupo 1002 $\Delta oppD$ - inoculado com 10^6 UFC da linhagem mutante. Os animais foram observados diariamente quanto à formação de abscessos no local da aplicação, nível de prostração e o número de óbitos (Figura 19)

Curva de sobrevivência

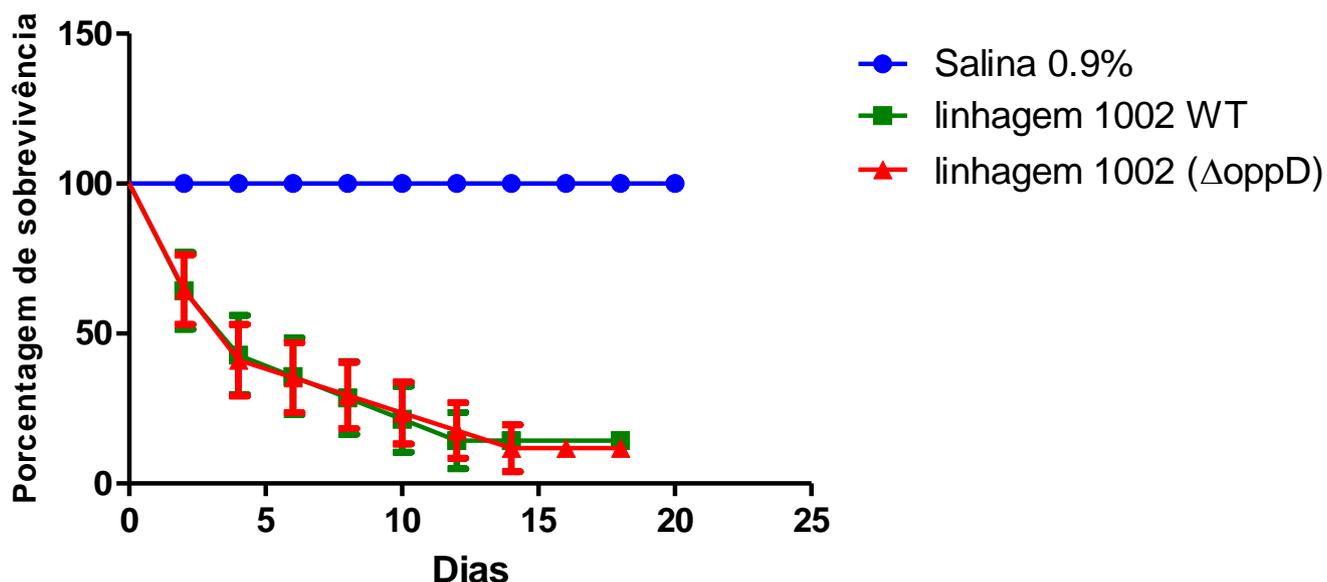


Figura 19. Curva de sobrevivência dos camundongos BALB/c infectados com as linhagens selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*. O gráfico foi plotado com auxílio do software GraphPad Prism v.5.0. através do teste *Kaplan-Meier survival curve*.

O gráfico mostra que não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevivência dos animais infectados com as linhagens selvagem e mutante de *C. pseudotuberculosis*, corroborando com o exame físico geral dos camundongos que também não mostrou nenhuma diferença entre os grupos infectados.

Esse mesmo resultado foi observado por Flores-Valdez e cols. (2009) em um estudo realizado com a bactéria *M. tuberculosis* em que foi avaliado a virulência de uma linhagem mutante para o transportador Opp através da infecção de camundongos BALB/c via aerossol. Esse trabalho mostrou que a linhagem mutante não apresentou uma diferença estatisticamente significativa na capacidade de causar morte em camundongos em relação à linhagem selvagem. Porém ao avaliar o potencial de colonização da linhagem mutante em órgãos como baço e pulmão durante as fases aguda, crônica e persistente da infecção foi observado que a carga bacteriana, durante a fase crônica da infecção, foi menor em animais inoculados com a linhagem mutante.

Diferente das infecções causadas por *M. tuberculosis* em camundongos, nas infecções por *C. pseudotuberculosis* só é possível recuperar bactérias vivas do baço dos animais infectados seis dias após a inoculação. Com isso os ensaios que visam avaliar a

capacidade de colonização do baço de camundongos infectados com *C. pseudotuberculosis* abrangem somente a fase aguda.

Para verificarmos se houve uma redução no potencial de colonização do baço durante a infecção de camundongos com a linhagem $\Delta oppD$ mutante de *C. pseudotuberculosis* foi feita a comparação entre a quantidade de UFCs das linhagens 1002(wt) e 1002($\Delta oppD$) de *C. pseudotuberculosis* recuperadas do baço de animais BALB/c durante a fase aguda da infecção (Figura 20).

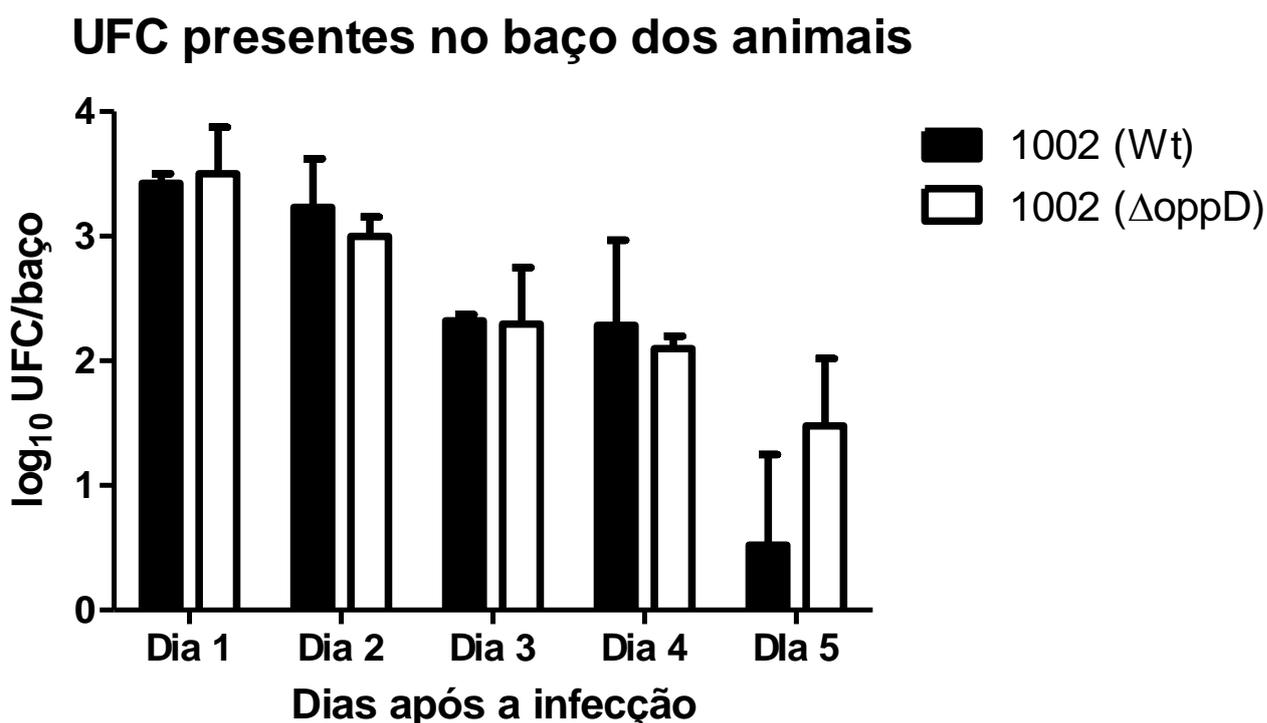


Figura 20. Unidades formadoras de colônia presentes no baço dos camundongos BALB/c infectados com as linhagens 1002(wt) selvagem e 1002($\Delta oppD$) mutante nos primeiros 5 dias de infecção.

O gráfico acima mostra que a carga bacteriana encontrada no baço dos camundongos infectados com a linhagem mutante não foi estatisticamente diferente da encontrada nos animais infectados com a linhagem selvagem (Figura 20).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que apesar de os ensaios *in vitro*, de adesão e viabilidade bacteriana em macrófagos murinos demonstrarem que a linhagem mutante possui um atraso, com relação à selvagem, na adesão à membrana celular de macrófagos em cultura, esse atraso não foi capaz de afetar à virulência dessa linhagem, uma vez que os ensaios *in vivo*, demonstraram que a mutação em *oppD* não

afetou o potencial da linhagem mutante de *C. pseudotuberculosis* em causar morte e lesão de camundongos, bem como não afetou a capacidade dessa linhagem em colonizar o baço dos animais infectados.

Tal fato também foi observado por Borezee e colaboradores (2000) em um trabalho realizado com a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes*. Nesse trabalho uma linhagem de *L. monocytogenes* mutante para a subunidade OppA apresentou uma capacidade reduzida de crescimento no interior de macrófagos murinos em comparação com a linhagem selvagem. Porém, apesar dessa diminuição, a linhagem mutante apresentou a mesma capacidade da linhagem selvagem em causar a morte de camundongos infectados.

Diferente do que foi observado em outros trabalhos realizados com bactérias patogênicas como *S. aureus*, *M. tuberculosis* e *S. pyogenes* (Borezee *et al.*, 2000; Sasseti *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Nos quais as linhagens mutantes para o transportador Opp apresentaram uma redução na virulência e patogenicidade em ensaios de infecção de camundongos. Em *C. pseudotuberculosis* a presença do transportador Opp funcional parece não ser necessária para a virulência dessa bactéria nesse modelo de infecção.

Para que possamos sugerir em quais processos celulares o transportador Opp está envolvido, já que a sua inativação ocasionou em uma alteração da expressão gênica da linhagem mutante (ver figuras 15 e 16) será necessário o sequenciamento das proteínas diferencialmente expressas com a posterior identificação dessas por meio de buscas em bancos de dados protéicos.

VI. CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho foi possível concluir que:

- O transportador de peptídeos Opp faz parte do *core* genoma de *C. pseudotuberculosis*, uma vez que os genes codificadores das suas subunidades são encontrados em todas as linhagens de *C. pseudotuberculosis* já sequenciadas até o momento.
- A utilização do tripeptídeo glutationa (GSH), como substrato tóxico, não foi capaz de fornecer uma confirmação fenotípica da perda da função do transporte de peptídeos na linhagem $\Delta oppD$ mutante de *C. pseudotuberculosis*.
- O transportador de peptídeos Opp provavelmente está envolvido em algum processo de comunicação intercelular via peptídeos sinalizadores em *C. pseudotuberculosis* uma vez que a inativação da subunidade oppD gerou uma mudança no perfil de proteínas secretadas da linhagem $\Delta oppD$ mutante de *C. pseudotuberculosis* em comparação com o perfil protéico da linhagem selvagem.
- A mutação em *oppD* não gerou uma redução da virulência e da patogenicidade da linhagem mutante, em modelo murino.

VII. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo abrem as seguintes perspectivas:

1. Avaliar a transcrição dos genes (*oppBCA*) por RT-PCR para que se possa analisar se a inserção do plasmídeo suicida no interior do gene *oppD* afetou a expressão dos outros genes contidos no operon *opp*.
2. Realizar o sequenciamento dos *spots* protéicos, exclusivos de cada linhagem, por espectrometria de massa para que se possam inferir em quais processos celulares essas proteínas estão relacionadas.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- BAIRD G.J. e FONTAINE M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J. Comp. Path.*, v. 137, p. 179-210, 2007.
- BASSLER BL. How bacteria talk to each other:regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 2:582–7, 1999.
- 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.
- 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.
- BOREZEE, E., E. PELLEGRINI, AND P. BERCHE. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect. Immun.* 68:7069–7077, 2000.
- BRAGA, W.U. Protection in alpacas against *Corynebacterium pseudotuberculosis* using different bacterial components. *Vet. Microbiol.*, v. 119, p. 297-303, 2007.
- BRAIBANT, M., P. GILOT, and J. CONTENT. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:449–467, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* v. 7, n. 72, p. 248-254. 1976.
- 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.
- BURRELL, D. H. Experimental induction of caseous lymphadenitis in sheep by intralymphatic inoculation of *Corynebacterium ovis*. *Research in Veterinary Science*, 24, 269-276, 1978.

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

CAMPOS, T. C. Uma abordagem econométrica do mercado potencial de carne de ovinos e caprinos para o Brasil. *Revista Econômica do Nordeste*, v. 30, n. 1, p. 26- 47, jan./mar. 1999.

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.

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.

CERDEIRA LT, PINTO AC, SCHNEIDER MP, DE ALMEIDA SS, DOS SANTOS AR, BARBOSA EG, ALI A, BARBOSA MS, CARNEIRO AR, RAMOS RT, DE OLIVEIRA RS, BARH D, BARVE N, ZAMBARE V, BELCHIOR SE, GUIMARÃES LC, DE CASTRO SOARES S, DORELLA FA, ROCHA FS, DE ABREU VA, TAUCH A, TROST E, MIYOSHI A, AZEVEDO V, SILVA A. Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* PAT10 strain isolated from sheep in Patagonia, Argentina. *J Bacteriol.*193(22), 2011a.

CERDEIRA LT, SCHNEIDER MP, PINTO AC, DE ALMEIDA SS, DOS SANTOS AR, BARBOSA EG, ALI A, ABURJAILE FF, DE ABREU VA, GUIMARÃES LC, SOARES SDE C, DORELLA FA, ROCHA FS, BOL E, GOMES DE SÁ PH, LOPES TS, BARBOSA MS, CARNEIRO AR, JUCÁ RAMOS RT, COIMBRA NA, LIMA AR, BARH D, JAIN N, TIWARI S, RAJA R, ZAMBARE V, GHOSH P, TROST E, TAUCH A, MIYOSHI A, AZEVEDO V, SILVA A. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain CIP 52.97, isolated from a horse in Kenya. *J Bacteriol.*193(24), 2011b.

ÇETINKAYA, B., KARAHAN, M., ATIL, E., KALIN, R., DE BAERE, T. & VANEECHOUTTE, M. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol* 88, 75–83, 2002.

CHAPLIN, P.J. et al. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.*, v. 67, n. 12, p. 6434–6438, dez. 1999.

COULTER, S., W. SCHWAN, E. NG, M. LANGHORNE, H. RITCHIE, S. WESTBROCK-WADMAN, W. HUFNAGLE, K. FOLGER, A. BAYER, and C. STOVER. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol. Microbiol.* 30:393–404 1998.

COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284:1318–22, 1999.

CUNDELL, D. R., B. J. PEARCE, J. SANDROS, A. M. NAUGHTON, AND H. R. MASURE. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect. Immun.* 63:2493–2498, 1995.

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.

D'AFONSECA V, PROSDOCIMI F, DORELLA FA, PACHECO LG, MORAES PM, PENA I, ORTEGA JM, TEIXEIRA S, OLIVEIRA SC, COSER EM. Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiol Res* 165:312-320, 2010

DARMSTADT, G. L., L. MENTELE, A. PODBIELSKI, AND C. E. RUBENS. Role of group A streptococcal virulence factors in adherence to keratinocytes. *Infect. Immun.* 68:1215–1221, 2000.

DETMERS FJ, LANFERMEIJER FC, POOLMAN B. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res Microbiol.* Apr-May;152(3-4):245-58, 2001.

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 FA, ESTEVAM EM, CARDOSO PG, SAVASSI BM, OLIVEIRA SC, AZEVEDO V, MIYOSHI A. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet Microbiol.* 31;114(3-4):298-303, 2006c.

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.

DUNNY GM, LEONARD BAB. Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 51:527–64, 1997.

ESTADÃO.COM.BR. Evolução da caprino e ovinocultura no Brasil. Disponível em: estadao.com.br/arquivo/economia/2006/not20060704p1387.htm Acesso em 06 de jan. 2012

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.

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.

FARIA, G. A. de; MORAIS, O. R. de; GUIMARÃES, P. H. S. Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Belo Horizonte: SEBRAE-MG, FAEMG e EMATER, 2004.

FLORES-VALDEZ MA, MORRIS RP, LAVAL F, DAFTE M, SCHOOLNIK GL *Mycobacterium tuberculosis* modulates its cell surface via an oligopeptide permease (Opp) transport system. *FASEB J* 23: 4091–4104, 2009.

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.

FRANK JM, DETMERS, FRANK C, LANFERMEIJER, BERT POOLMAN. Peptides and ATP-binding Cassette peptide transporter. *Res. Microbiol.* 152 : 245–258, 2001.

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.

GREEN, R.M., SETH, A. AND CONNELL, N.D. A peptide permease mutant of *Mycobacterium bovis* BCG resistant to the toxic peptides glutathione and S-nitrosoglutathione. *Infect. Immun.* 68, 429-436, 2000.

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.

HIGGINS CF. ABC transporters: from microorganisms to men. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67–113, 1992.

HIRON A. BOREZEE-DURANT E. PIARD J-C. JUILLARD V. Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Bacteriology*, p. 5119–5129, July 2007

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.; 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.

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, D. & COLLINS, M. D.. Irregular, nonsporng gram-positive rods, section 15. pages 1261–1579 in *bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG (Eds.). Williams & Wilkins, Co., Baltimore, MD, 1986.

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

KALOGERAKI, V. S. AND WINANS, S. C. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene* 188(1), 69-75, 1996.

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.

KLOSE, K. E., AND J. J. MEKALANOS. Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect. Immun.* 65:587–596, 1997.

LAPIERRE P & GOGARTEN JP. Estimating the size of the bacterial pan-genome. *Trends Genet.* 25: pp. 107-110, 2009.

LAZAZZERA, B. A. The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides* 22:1519–1527, 2001.

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.

LEONARD BAB, PODBIELSKI A, HEDBERG PJ, DUNNY GM. Enterococcus faecalis pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Pro Natl Acad Sci USA*; 93:260–4, 1996

- 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.
- MARQUIS, H., H. G. A. BOUWER, D. J. HINRICHS, AND D. A. PORTNOY. 1993. Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect. Immun.* 61:3756–3760, 1993.
- MCNAMARA, P. J., G. A. BRADLEY, J. G. SONGER. Targeted mutagenesis of the phospholipase D results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 12: 921–930, 1994.
- 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.
- MANIATIS, T., E. F. FRITSCH, AND J. SAMBROOK. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*, 1982.
- MCKEAN, S; DAVIES, J; MOORE, R. Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes and Infection*, 7(13):1352-1363, 2005.
- McKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiol.* v. 153, p. 2203-2211, 2007a.
- MCKEAN, S. C., J. K. DAVIES AND R. J. MOORE. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 degrees C. *Res Microbiol.* 158: 279-286, 2007b.
- 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, p. 425–440, 1967.
- MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.*, v. 26, p. 1005–1011, 1997.
- MONNET, V. Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60. 2100-2114, 2003.
- 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.
- MOURA-COSTA, L. F. et al. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Rev Bras. Saúde Prod An.* v. 3, n. 1, p. 1-9. 2002.

- MUCKLE, C.A.; GYLES, C.L. Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Can. J. Comp. Med., v. 46, p. 206–208, 1982.
- MUZZI A, MASIGNANI V & RAPPUOLI R. The pan-genome: towards a knowledge-based discovery of novel targets for vaccines and antibacterials. Drug Discov. Today 12: pp. 429-439, 2007.
- NAGY, G. Caseous lymphadenitis in sheep cmethods of infection. Journal of the South AfricanVeterinaryAssociation, 47,197-199, 1976.
- NEALSON KH, HASTINGS JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol. Rev.43:496–518. 1979.
- 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.
- 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, J.B.A. et al. 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.
- PAYNE, J. W., AND C. GILVARG. The role of the terminal carboxyl group on peptide transport in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 243:335–340, 1968.
- 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.
- PEREGO, M., HIGGINS, C.F., PEARCE, S.R., GALLAGHER, M.P., AND HOCH J.A. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. Mol. Microbiol. 5, 173–185, 1991

PEREGO M, HOCH JA. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl. Acad Sci USA*. 93: 1549–53, 1996.

PIONTKOWSKI, M.D.; SHIVERS, 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.

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

QUIOCHO, F.A., AND LEDVINA, P.S. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis. Variation of common themes. *Mol. Mic.* **20**:17-25, 1996.

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

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.

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.

RUIZ JC, D'AFONSECA V, SILVA A, ALI A, PINTO AC, SANTOS AR, ROCHA AA, LOPES DO, DORELLA FA, PACHECO LG, COSTA MP, TURK MZ, SEYFFERT N, MORAES PM, SOARES SC, ALMEIDA SS, CASTRO TL, ABREU VA, TROST E, BAUMBACH J, TAUCH A, SCHNEIDER MP, MCCULLOCH J, CERDEIRA LT, RAMOS RT, ZERLOTINI A, DOMINITINI A, RESENDE DM, COSER EM, OLIVEIRA LM, PEDROSA AL, VIEIRA CU, GUIMARÃES CT, BARTHOLOMEU DC, OLIVEIRA DM, SANTOS FR, RABELO ÉM, LOBO FP, FRANCO GR, COSTA AF, CASTRO IM, DIAS SR, FERRO JA, ORTEGA JM, PAIVA LV, GOULART LR, ALMEIDA JF, FERRO MI, CARNEIRO NP, FALCÃO PR, GRYNBERG P, TEIXEIRA SM, BROMMONSCHENKEL S, OLIVEIRA SC, MEYER R, MOORE RJ, MIYOSHI A, OLIVEIRA GC, AZEVEDO V. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*. 6(4), 2011

RUTHERFORD K, PARKHILL J, CROOK J, HORSNELL T, RICE P, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944–945, 2000.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., AND MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y, 1989.

SAMEN, U., B. GOTTSCHALK, B. J. EIKMANN, AND D. J. REINSCHEID. Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.* 186:1398–1408, 2004.

SASSETTI, C. M., AND RUBIN, E. J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 12989–12994, 2003.

SERES, T., R. G. KNICKELBEIN, J. B. WARSHAW, AND R. B. JOHNSTON, JR. The phagocytosis-associated respiratory burst in human monocytes is associated with increased uptake of glutathione. J. Immunol. 165:3333–3340. 2000.

SCOTT, P.R. The Skin. In: SCOTT, P.R. Sheep Medicine. London: Mason Pub, p. 246-248. 2007.

STURME, M.H.J.; KLEEREBEZEM, M.; NAKAYAMA, J.; AKKERMANS, A.D.L.; VAUGHAN, E. E; DE VOS, W. M. "Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria", Antonie van Leeuwenhoek 81, 1/4: 233 - 243. 2002.

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.

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

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.

SMID, E. J., R. PLAPP, AND W. N. KONINGS. 1989. Peptide uptake is essential for growth of *Lactococcus lactis* on the milk protein casein. J. Bacteriol. 171:5286–5292

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.; 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. The Genus *Corynebacterium*. In: SONGER, J.G. Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease. St. Louis: Elsevier Saunders, p. 72-80, 2005.

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.

STEWART, G. R., PATEL, J., ROBERTSON, B. D., RAE, A., AND YOUNG, D. B. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog.* 1, 269–278, 2005.

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.

TETTELIN H, MASIGNANI V, CIESLEWICZ MJ, DONATI C, MEDINI D, WARD NL, ANGIUOLI SV, CRABTREE J, JONES AL, DURKIN AS, DEBOY RT, DAVIDSEN TM, MORA M, SCARSELLI M, MARGARIT Y ROS I, PETERSON JD, HAUSER CR, SUNDARAM JP, NELSON WC, MADUPU R, BRINKAC LM, DODSON RJ, ROSOVITZ MJ, SULLIVAN SA, DAUGHERTY SC, HAFT DH, SELENGUT J, GWINN ML, ZHOU L, ZAFAR N, KHOURI H, RADUNE D, DIMITROV G, WATKINS K, O'CONNOR KJB, SMITH S, UTTERBACK TR, WHITE O, RUBENS CE, GRANDI G, MADOFF LC, KASPER DL, TELFORD JL, WESSELS MR, RAPPUOLI R, FRASER CM: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:13950-13955, 2005.

TROST E, OTT L, SCHNEIDER J, SCHRÖDER J, JAENICKE S, GOESMANN A, HUSEMANN P, STOYE J, DORELLA FA, ROCHA FS, SOARES SDE C, D'AFONSECA V, MIYOSHI A, RUIZ J, SILVA A, AZEVEDO V, BURKOVSKI A, GUISO N, JOIN-LAMBERT OF, KAYAL S, TAUCH A: The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*. vp.11, p.728, 2010.

WANG, C. H., C. Y. LIN, Y. H. LUO, P. J. TSAI, Y. S. LIN, M. T. LIN, W. J. CHUANG, C. C. LIU, AND J. J. WU. Effects of oligopeptide permease in group A streptococcal infection. *Infect. Immun.* 73:2881–2890, 2005.

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

WOOLDRIDGE, K. et al. Bacterial secreted proteins secretory mechanisms and role in pathogenics, 512p. 2009.

ZANELLA, M. A. Mercado mundial de carne ovina e caprina. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA. Superintendência Técnica. Brasília, jul.2007.

IV. ANEXOS

IV.1 . Resultado do sequenciamento do clone da biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis* e do BLAST da sequência gerada contra o genoma de *C. pseudotuberculosis*.

| | |
|--|---|
| <pre>>B03 well B03 placa Pablo 11-06-2008 Run02 Cimarron GGGAGGGTACCGAGCGCAGTGATCCAAATAGGTTANACTATAGGGCGAATT GAATCAGCGGCCGTGAATCGCCCTTACCGCAGACAA CGTCA TGGTTATGT ATGCAGGACGCCCTGTAGAATAACGCCGGCGT CATGAGCTCTTCAGT GAGC CCAAAATGCCTTATACCGTCGGCTTGCTTGGTTCTATTCCCTCCGT GCGC AAACGTGAGAAAGTCTCCCTCACACATATTGAGGGCAGCCC TCCTATCGT GGTTAATCTTCCCGACGAATGCTCCTTCGCTCCCCGCTGCC CTATAGCTA CAGCCGAATGCCTTAAAAC TGAGCCC GGGCTCTTATCCATCAATGATAAG CACCAGGCGGCATGCATCCGTTCTAC TGAGATCAGC CATGGAGAAC TTAA CGGCAGCTCCGATTTTCCCACGCGCCCGTTCACGAGGGT GCTCTCATG CGGATTCCTCGGAAAAGCGCTCCTGCGTTC CAGC GTCTC TGACC TGAC TAAAACATTTCTTTGGTCAAAGGCA GCCCTGCTTAAACGA ACTTGTGGG AGAAGTGCGGGCGTTAACGGTTTAACTTTT GATATCAAAGAAGGC GAGT GCTTTGCTATCGTCGGCGAATCCGGA TGCGGAAAA CCACCACCTT GCTG GAGATCATGGATCTAGCCCCGCAAGC GCCGATCAAATCAA TTAGGTGAG AAAGACCGTCGCAGGCATCTCCAAGC GTCAA CGGACGTCTTCTAAC GAAN ACGACCATTCAAAATGTACCAAGAA CCCATGGNGGGGCTC TTGAA TCAC NGGGGGCCATCTCAAAC TGGGTCCGCACAGAAAGAAATTACCTCCC GGGG GAAAGGACCTCCNTGGGAAAAATNTC CCTTGAGGGGCCTAGGGGAANA CGGNAAAAACAAAATGGAACCGCGGAGATCAC CGGNAAAAAC TCAATCCAC GANAAACAGACCGGGTAAAACCCCGTGGCA CAATTACACAATCACNAAG TAACACACGNGAGCACACN</pre> | <pre>>C03 well C03 placa Pablo 11-06-2008 Run02 Cimarron CAGTATAGCAGCTCAGAATACCCCTCAGGATTAGGACTAGTCTGCAGGTT TAAACGAATTCGTTACCTTACATCACGGCGGCACGGTCTGAGATATGCCG AATAACGGAGAGATCGTGAGCCACAAAAAGATAGCTGATACCCAGGCGCG CTTTGAGCTCATCAAGGAGATT CAGCA TTCGGCCTGGACAGAGACGTCC AGGGCAGACACAGGCTCATCAAGAACAATCAACTTGGGATTGGCCGCAAG CGCACGGGCAAGAGATATACGCTGGCGTTGTCACCGGAAAAATGGCCAG GGAACCTAATCAATATGAATATGAGCAGGGTTTAGCCGACTAACTGGAT GAGCTCGCGGATACGCTCATT TTTATCGCCATCCCAGCCCAAGGAATCCA GAGGCTCCCGGAGAATCTCTGCGACAGT GAGGCGCGGATCAAGAGCCCC ATGGGGTCTTTGGAAAACAATTTGAATGCTTTTCTTAGAAGACGCGGTTG ACGCTTTGGAGATGCCTGCGAGCTCTTTCTCACCTAATTTGATTTGAGTCCG GCGCTTGCGGGCTAGATCCATGATCTCCAGCAAGGTGGTGGTTTTNCCC GCATCCGGATTGCGCCGACGATAGCAAAGCACTGCGCTTCTTTAGATATCA AAAGTTAAACCGTTAACGGCCCGCACTTCTCCACAGATCGTTAAGCAGG GCGCTTTGACCAAAGGANAATGTTAAGTCAGGTCAAGAGACGCTGAGAA CGCANGAGACGCTTTTCCCAGGGCAATCCCGCATGAGAGCACCACCTCG TTGGAACAGGGCGGCGTGGNGCAAATCGGGAACACGNCCCGAGTTAA AGNTTACCACAAGGGGTGGANC TACGTA AAAACGGAATTGCCATTGCAC GGNCCTGGGTGGCTTAATAACATGGGACAGGATTACA AAGCACCGGGANC CAAAGTAAGGGCACANCCGCNCGTAAGAAAAANAGGAACAAGCGGAAAA CNACAAGGAACATGAACGGGAAATACACNA</pre> |
|--|---|

Figura IV.1. Resultado do sequenciamento do fragmento clonado utilizando os iniciadores M13F e M13R respectivamente.

BLASTN 2.2.18 [Mar-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= i»¿Contig oppD (CAP3)
(1195 letters)

Database: Cp
1 sequences; 2,496,273 total letters

Searching.....done

| Sequences producing significant alignments: | Score | E |
|---|--------|---|
| Value | (bits) | |

| | | |
|---|------|--|
| C.pseudo-WG-V2-final standard; DNA; UNC; 2496273 BP., 2496273 ba... | 2133 | |
| 0.0 | | |

>C.pseudo-WG-V2-final standard; DNA; UNC; 2496273 BP., 2496273 bases,
C7EA6A4A checksum.
Length = 2496273

Score = 2133 bits (1076), Expect = 0.0
Identities = 1083/1084 (99%), Gaps = 1/1084 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 45 taccgcagacaacgtcatggttatgtatgcaggacgccctgtagaatacggcggttca
104

|||||
Sbjct: 477518 taccgcagacaacgtcatggttatgtatgcaggacgccctgtagaatacggcggttca
477459

Query: 105 tgagctcttcagtgagcccaaatgccttataccgctcggttgcttggttctattccctc
164

|||||
Sbjct: 477458 tgagctcttcagtgagcccaaatgccttataccgctcggttgcttggttctattccctc
477399

Query: 165 cgtgcgcaaacgtgagaaagtctccctcaccactattgagggcagccctcctatcgtggt
224

|||||
Sbjct: 477398 cgtgcgcaaacgtgagaaagtctccctcaccactattgagggcagccctcctatcgtggt
477339

Query: 225 taatcttcccagcgaatgctccttcgctccccgctgcctatagctacagccgaatgcct
284

|||||
Sbjct: 477338 taatcttcccagcgaatgctccttcgctccccgctgcctatagctacagccgaatgcct
477279

Query: 285 taaaactgagcccgggctcttatccatcaatgataagcaccaggcggcatgcatccgttc
 344
 |
 Sbjct: 477278 taaaactgagcccgggctcttatccatcaatgataagcaccaggcggcatgcatccgttc
 477219

Query: 345 tactgagatcagccatggagaacttaacggcgctccgattttccccacgccgccgttca
 404
 |
 Sbjct: 477218 tactgagatcagccatggagaacttaacggcgctccgattttccccacgccgccgttca
 477159

Query: 405 cgagggtgctctcatgcggttctcgggaaaagcgctcctgcggttctcagcgtctctga
 464
 |
 Sbjct: 477158 cgagggtgctctcatgcggttctcgggaaaagcgctcctgcggttctcagcgtctctga
 477099

Query: 465 cctgactaaaacatttcctttggtcaaaggcgccctgcttaaacgaactgtgggagaagt
 524
 |
 Sbjct: 477098 cctgactaaaacatttcctttggtcaaaggcgccctgcttaaacgaactgtgggagaagt
 477039

Query: 525 gcgggccggttaacgggttaacttttgatatcaaagaaggcgagtgctttgctatcgtcgg
 584
 |
 Sbjct: 477038 gcgggccggttaacgggttaacttttgatatcaaagaaggcgagtgctttgctatcgtcgg
 476979

Query: 585 cgaatccggatgcgggaaaaccaccaccttgctggagatcatggatctagccccgcaagc
 644
 |
 Sbjct: 476978 cgaatccggatgcgggaaaaccaccaccttgctggagatcatggatctagccccgcaagc
 476919

Query: 645 gccgactcaaatccaattaggtgagaaagacgtcgcaggcatctccaagcgtcaacggcg
 704
 |
 Sbjct: 476918 gccgactcaaatccaattaggtgagaaagacgtcgcaggcatctccaagcgtcaacggcg
 476859

Query: 705 tcttctaagaaaagacattcaaattgttttccaagaccccatgggggctcttgatccgcg
 764
 |
 Sbjct: 476858 tcttctaagaaaagacattcaaattgttttccaagaccccatgggggctcttgatccgcg

Query: 765 cctcactgtcgcagagattctccgggagcctctggattccttgggctgggatggcgataa
 824
 |
 Sbjct: 476798 cctcactgtcgcagagattctccgggagcctctggattccttgggctgggatggcgataa
 476739

```

Query: 825      aatgagcgtatccgcgagctcatccagttagtcgggctaaaccctgctcatattcatat
884
                |||
Sbjct: 476738  aatgagcgtatccgcgagctcatccagttagtcgggctaaaccctgctcatattcatat
476679

Query: 885      tgataggttccctggccatTTTTccggtggacaacgccagcgtatatctcttgcccgtgc
944
                |||
Sbjct: 476678  tgataggttccctggccatTTTTccggtggacaacgccagcgtatatctcttgcccgtgc
476619

Query: 945      gcttgccgccaatcccaagttgattggttcttgatgagcctgtgtctgccctggacgtctc
1004
                |||
Sbjct: 476618  gcttgccgccaatcccaagttgattggttcttgatgagcctgtgtctgccctggacgtctc
476559

Query: 1005     tgtccaggccggaatgctgaatctccttgatgagctcaaagcgcgcctgggtatcagcta
1064
                |||
Sbjct: 476558  tgtccaggccggaatgctgaatctccttgatgagctcaaagcgcgcctgggtatcagcta
476499

Query: 1065     tctttttgtggctcacgatctctccggtattcggcatattctcagaccgtgccgccgtga
1124
                |||
Sbjct: 476498  tctttttgtggctcacgatctctccggtattcggcata-tctcagaccgtgccgccgtga
476440

Query: 1125     tgta 1128
                |||
Sbjct: 476439  tgta 476436

```

Figura IV.2. Resultado do BLAST entre a sequência do fragmento clonado e o genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

IV.2. Currículum Vitae

Pablo Matias Ribeiro de Oliveira Moraes
Currículum Vitae

Fevereiro/2012

Pablo Matias Ribeiro de Oliveira Moraes

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Pablo Matias Ribeiro de Oliveira Moraes
Nome em citações bibliográficas MORAES, P. M. R. O.;Moraes, Pablo M.;Moraes, Pablo M. R. O.
Sexo masculino
Filiação Ermelindo Antônio Ribeiro de Oliveira Moraes e Paula Valeria Souza Matias
Nascimento 06/01/1987 - Belo Horizonte/MG - Brasil
Carteira de Identidade MG11911262 ssp - MG - 23/07/1998
CPF 08173392641

Endereço residencial Rua Francisco Ovídio nº336
Caiçara - Belo Horizonte
30770-040, MG - Brasil
Telefone: 31 84265184

Endereço profissional Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas,
Departamento de Biologia Geral
Av Antônio Carlos 6627 LGCM - Laboratório de Genética Celular e Molecular
Pampulha - Belo Horizonte
31270-901, MG - Brasil
Telefone: 31 34092873

Endereço eletrônico
e-mail para contato : pablomm6@hotmail.com
e-mail alternativo : pablomm6@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2010** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: Caracterização do internalizador de oligopeptídeos (Opp) em *Corynebacterium pseudotuberculosis* e o estudo do seu papel na virulência e patogenicidade dessa bactéria.
Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: Corynebacterium pseudotuberculosis, Linfadenite Caseosa
Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos
- 2006 - 2009** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: Estudo do papel do operon opp na virulência e patogenicidade de *Corynebacterium pseudotuberculosis*
Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Genética Forense.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Formação em docência do ensino superior.

Rede de desenvolvimento de praticas de ensino superior, GIZ UFMG PROGRAD, Brasil

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Curso de ciências forenses.
Renova cursos, RENOVA CURSOS, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Biotecnologia de Microorganismos.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Montagem e anotação de genoma.
Centro de pesquisa René Rachou/ Fiocruz minas, CPQRR, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Curso de perícia criminal (toxicologia forense).
Integra Cursos e Eventos, INC, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Redação de artigos científicos.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Mini-curso Bioinformática.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Estudante Mestrado , Enquadramento funcional: Mestrando,
Regime: Dedicção Exclusiva

2010 - Atual Vínculo: Docente/ Bolsista REUNI , Enquadramento funcional: Aluno de
Mestrado , Carga horária: 5, Regime: Parcial
Outras informações:

Experiência didática adquirida como docente/bolsista REUNI. Desde o primeiro semestre de 2010 leciono sob orientação e supervisão dos professores: Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Ana Lúcia Brunialti Godard, Maria Raquel Santos Carvalho e Vilma Lopes aulas de Genética para os seguintes cursos de graduação da Universidade Federal de Minas Gerais:Terapia Ocupacional (2010/1) Introdução a Genética e Evolução (15 h) BIG869;Medicina (2010/2 a 2011/1) Genética e Evolução (30 h) BIG601;Enfermagem (2011/2) Fundamentos de Genética e Evolução (15 h) BIG001.

2007 - 2010 Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Iniciação Científica
- Estudante , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:

Bacharel em Ciências biológicas com ênfase na área de saúde e biotecnologia, trabalhou 3 anos como iniciação científica no Laboratório de genética celular e molecular do Departamento de Biologia Geral - ICB, orientado pelo Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Neste laboratório trabalhou em diversos projetos tendo contato com técnicas de biologia molecular e participou ativamente no desenvolvimento de pesquisa. Nesse mesmo laboratório desenvolveu o projeto da sua monografia intitulada: 'Estudo do papel do operon opp na virulência e patogenicidade de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.'

Atividades

2007 - Atual Projetos de pesquisa, Instituto de Ciências Biológicas

Participação em projetos:

*Estudos pangenômicos e de genômica comparativa entre diferentes linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a erradicação da linfadenite caseosa*

Projetos

2007 - Atual Estudos pangenômicos e de genômica comparativa entre diferentes linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a erradicação da linfadenite caseosa

Descrição: Projeto de Pesquisa: Desenvolvimento da tese intitulada: 'Estudos pangenômicos e de genômica comparativa entre diferentes linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a erradicação da linfadenite caseosa'. O projeto de doutorado conta com a parceria entre três instituições: Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal do Pará e Instituto de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ. Os dados gerados para o projeto são oriundos de sequenciadores next-generation SOLiD e as análises de genômica comparativa e pangenômica das diferentes linhagens do patógeno citado acima, serão realizadas em duas etapas: 1) validação dos dados gerados pelas novas tecnologias de sequenciamento SOLiD em uma abordagem de montagem de genomas 'ab initio'; implementação de um pipeline adequado que realize a análise ab initio de montagem e; 2) Genômica comparativa e pangenômica

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2); Doutorado (6);

Integrantes: Pablo Matias Ribeiro de Oliveira Moraes; Vívian D'Afonseca da Silva de Resende; Anderson Miyoshi; Vasco Azevedo (Responsável); pinto ac; ALMEIDA, S.; Anderson santos; Siomar Soares; Jerônimo Conceição Ruiz; Artur Silva; Daniela de Melo Resende; Rommel Thiago Jucá Ramos; Louise Teixeira Cerdeira; Robert Moore

Financiador(es):

Áreas de atuação

1. Genética Molecular e de Microorganismos
2. Biologia e Fisiologia dos Microorganismos
3. Microbiologia Aplicada
4. Bioquímica
5. Biologia Molecular

Idiomas

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

Prêmios e títulos

2010 1º colocado no concurso para entrada no Mestrado em Genética, Pós graduação em Genética ICB, UFMG

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Ruiz, Jerônimo C., D'Afonseca, Vívian, Silva, Artur, Ali, Amjad, Pinto, Anne C., Santos, Anderson R.,

Rocha, Aryanne A. M. C., Lopes, Débora O., Dorella, Fernanda A., Pacheco, Luis G. C., Costa, Marcília P., Turk, Meritxell Z., Seyffert, Núbia, Moraes, Pablo M. R. O., Soares, Siomar C., Almeida, Sintia S., Castro, Thiago L. P., Abreu, Vinicius A. C., Trost, Eva, Baumbach, Jan, Tauch, Andreas, Schneider, Maria Paula C., McCulloch, John, Cerdeira, Louise T., Ramos, Rommel T. J., Zerlotini, Adhemar, Dominitini, Anderson, Resende, Daniela M., Coser, Elisângela M., Oliveira, Luciana M., Pedrosa, André L., Vieira, Carlos U., Guimarães, Cláudia T., Bartholomeu, Daniela C., Oliveira, Diana M., Santos, Fabrício R., Rabelo, Élide Mara, Lobo, Francisco P., Franco, Glória R., Costa, Ana Flávia

Evidence for Reductive Genome Evolution and Lateral Acquisition of Virulence Functions in Two *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strains. *Plos One.* , v.6, p.e18551 - , 2011.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digitalHome page: [doi:10.1371/journal.pone.0018551]

2. D' Afonseca, Vívian, Prosdocimi, Francisco, Dorella, Fernanda A., Pacheco, Luis Gustavo C., MORAES, P. M. R. O., Pena, Izabela, Ortega, José Miguel, Teixeira, Santuza, Oliveira, Sérgio Costa, Coser, Elisângela Monteiro

Survey of genome organization and gene content of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Microbiological Research (Print).* , v.165, p.312 - 320, 2010.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digitalHome page: [doi:10.1016/j.micres.2009.05.009]

3. D'AFONSECA, V., MORAES, P. M. R. O., D' Afonseca, V., Dorella, F.A., PACHECO, L.G.C., MEYER, R., Portela, R.W., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular Research.* , v.7, p.252 - 260, 2008.

Palavras-chave: Corynebacterium pseudotuberculosis

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Dorella, F.A., RIBEIRO, D., GUIMARÃES, A.S., ROCHA, F.S., LEITE, K.M.C., MORAES, P. M. R. O., MARQUES, W.S., ANTUNES, C.A., SEYFFERT, N., GALA-GARCIA, A., ROCHA, A.A.M.C., SILVA, T.M.A., EL-AOUAR FILHO, R.A., SANTOS, R.L., GOUVEIA, A.M.G., AZEVEDO, V.

ANÁLISE DO POTENCIAL VACINAL DE UMA LINHAGEM RECOMBINANTE DE <I>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</I> EM CAPRINOS In: 26 CONGRESSO DE MICROBIOLOGIA, 2011, FOZ DO IGUAÇU.

ANÁLISE DO POTENCIAL VACINAL DE UMA LINHAGEM RECOMBINANTE DE <I>CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS</I> EM CAPRINOS. , 2011.

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

2. ANTUNES, C.A., GUIMARÃES, A.S., SILVA, W.M., CASTRO, T. L. P, RIBEIRO, D., Dorella, F.A., SILVA.R.F., GALA-GARCIA, A., CARVALHO, R.D.O., MORAES, P. M. R. O., ROCHA, F.S., MAGALHÃES, A., ALMEIDA, S., EL-AOUAR FILHO, R.A., GOUVEIA, A.M.G., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., SEYFFERT, N.

AVALIAÇÃO DE UM TESTE INTRADÉRMICO DE HIPERSENSIBILIDADE COM ANTÍGENOS SECRETADOS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* PARA O DIAGNÓSTICO SUBCLÍNICO DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS In: 26 CONGRESSO DE MICROBIOLOGIA, 2011, FOZ DO IGUAÇU.

AVALIAÇÃO DE UM TESTE INTRADÉRMICO DE HIPERSENSIBILIDADE COM ANTÍGENOS SECRETADOS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* PARA O DIAGNÓSTICO SUBCLÍNICO DA LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS. , 2011.

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

3. GALA-GARCIA, A., CARNEIRO, M.B.H., DORELLA, F., RIBEIRO, D., ROCHA, F.S., SILVA, W.M., SEYFFERT, N., CASTRO, T. L. P, CARVALHO, R.D.O., EL-AOUAR FILHO, R.A., MORAES, P. M. R. O., ANTUNES, C.A., LEITE, K.M.C., SILVA.R.F., ALMEIDA, S., GUIMARAES, L.C., MILITAO, F.C., VIEIRA, L.Q., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS, IN VITRO, POR UMA LINHAGEM MUTANTE DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS* In: 26 CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2011, FOZ DO IGUAÇU.

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS, IN VITRO, POR UMA LINHAGEM MUTANTE DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*. , 2011.

4. ROCHA, F. S., DORELLA, F., MORAES, P. M. R. O., COSTA, K. M., 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-SP.

Avaliação da Capacidade Protetora de uma Linhagem Mutante de *Corynebacterium pseudotuberculosis* como Promissora Vacina no Combate à Linfadenite Caseosa em Caprinos. , 2010.

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

5. MORAES, P. M. R. O., D'AFONSECA, V., COSTA, M.P., HIRATA JUNIOR, R., ROCHA, F. S., OLIVEIRA, C. A. A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Estudo do papel do operon OppD na virulência e patogenicidade de *Corynebacterium pseudotuberculosis* In: 56 Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá-SP.

Estudo do papel do operon OppD na virulência e patogenicidade de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. , 2010.

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

6. DORELLA, F., PACHECO, L.G.C., SEYFFERT, N., PINTO, A. C, D'AFONSECA, V., CASTRO, T. L. P, OLIVEIRA, S. C, MEYER, R., MORAES, P. M. R. O., AZEVEDO, V.

Analysis of the vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador-BA.

Analysis of the vaccine potential of *Corynebacterium pseudotuberculosis* mutants obtained through random mutagenesis. , 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português.

7. D'AFONSECA, V., MORAES, P. M. R. O., DORELLA, F., PACHECO, L.G.C., ALMEIDA, S., PINTO, A. C, SANTOS, A. R., SEYFFERT, N., CASTRO, T. L. P, SOARES, S. C., PROSDOCIMI, F., PENA, I., ORTEGA, J. M., OLIVEIRA, S. C, OLIVEIRA, L. M., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Caracterização do conteúdo gênico e organização genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador_BA.

Caracterização do conteúdo gênico e organização genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. , 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português.

8. D'AFONSECA, V., MORAES, P. M. R. O., DORELLA, F., PACHECO, L.G.C., ALMEIDA, S., PINTO, A. C, SANTOS, A. R., SEYFFERT, N., SOARES, S. C., CASTRO, T. L. P, PROSDOCIMI, F., PENA, I., ORTEGA, J. M., PORTELA, R. W., OLIVEIRA, S. C, MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e sua caracterização através de Genome Sequence Survey (GSS) In: 26 Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador - BA..

26 Reunião de Genética de Microrganismos. , 2008.

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

9. SEYFFERT, N., PACHECO, L.G.C., CASTRO, T. L. P, DORELLA, F., PINTO, A. C, SOARES, S. C., MORAES, P. M. R. O., D'AFONSECA, V., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Integração da genômica e proteômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o imunodiagnóstico da linfadenite caseosa In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador-BA.

Integração da genômica e proteômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o imunodiagnóstico da linfadenite caseosa. , 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português.

10. PACHECO, L.G.C., CASTRO, T. L. P, SEYFFERT, N., DORELLA, F., PINTO, A. C, D'AFONSECA, V., SOARES, S. C., MORAES, P. M. R. O., MEYER, R., OLIVEIRA, S. C, MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Papel do fator sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência In: Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador -BA.

Papel do fator sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência. , 2008.

Referências adicionais : Brasil/Português.

11. D'AFONSECA, V., MORAES, P. M. R. O., PACHECO, L.G.C., DORELLA, F., CAPANEMA, E.R., PENA, I., PROSDOCIMI, F., ORTEGA, J. M., MEYER, R., OLIVEIRA, G. C., OLIVEIRA, S. C, MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Partail-genome sequence through GSS analyses and comparative genomic og Corynebacterium pseudotuberculosis the ethiological agent of Caseous Limphadenitis Disease In: 24 ° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasilia-DF.

Partail-genome sequence through GSS analyses and comparative genomic og Corynebacterium pseudotuberculosis the ethiological agent of Caseous Limphadenitis Disease. , 2007.

Referências adicionais : Brasil/Português.

Apresentação de Trabalho

1. MORAES, P. M. R. O., D'AFONSECA, V., PACHECO, L.G.C., DORELLA, F., CASTRO, T. L. P, SEYFFERT, N., COSTA, M.P.

Inativação do gene oppD e a avaliação do seu papel na virulência e patogenicidade de Corynebacterium pseudotuberculosis, 2009. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: ICB; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XVIII Semana de iniciação científica; Inst.promotora/financiadora: UFMG

2. D'AFONSECA, V., MORAES, P. M. R. O., DORELLA, F., PACHECO, L.G.C., PROSDOCIMI, F., PENA, I., ORTEGA, J. M., OLIVEIRA, S. C, COSER, E. M., OLIVEIRA, L. M., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Construção de uma biblioteca genômica de Corynebacterium pseudotuberculosis e caracterização através de genome sequence survey, 2008. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Instituto Ciências Biológicas UFMG; Cidade: Belo Horizonte; Evento: I Simpósio de genética e biotecnologia da UFMG; Inst.promotora/financiadora: Progama de pós-graduação em genética

3. MORAES, P. M. R. O., D'AFONSECA, V., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Estudo do papel dos genes oppD, pip e php na virulência e patogenicidade de Corynebacterium pseudotuberculosis, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: ICB; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XVII Semana de iniciação científica; Inst.promotora/financiadora: UFMG

4. MORAES, P. M. R. O., D'AFONSECA, V., DORELLA, F., PACHECO, L.G.C., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.
Caracterização parcial do genoma de Corynebacterium pseudotuberculosis através de GSS e genômica comparativa, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Instituto de ciências biológicas ICB; Cidade: Belo Horizonte; Evento: XVI Semana de Iniciação científica; Inst.promotora/financiadora: UFMG

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **56 Congresso Brasileiro de Genética, 2010. (Congresso)**
Estudo do papel do operon OppD na virulência e patogenicidade de Corynebacterium pseudotuberculosis.

2. **XXI Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2009. (Congresso)**

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I simpósio de Genética e Biotecnologia da UFMG, 2008. (Simpósio)**

Construção de uma biblioteca genômica de Corynebacterium pseudotuberculosis e caracterização através de GSS.

Totais de produção

Produção bibliográfica

| | |
|--|----|
| Artigos completos publicados em periódico..... | 3 |
| Trabalhos publicados em anais de eventos..... | 11 |
| Apresentações de Trabalhos (Simpósio)..... | 1 |
| Apresentações de Trabalhos (Outra)..... | 3 |

Eventos

| | |
|---|---|
| Participações em eventos (congresso)..... | 2 |
| Participações em eventos (simpósio)..... | 1 |