

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



Dissertação de Mestrado

Caracterização e expressão heteróloga de proteínas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a otimização de um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade para o diagnóstico da Linfadenite Caseosa

Renata de Faria Silva

ORIENTADORA: Dra. Núbia Seyffert

COORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Azevedo

Renata de Faria Silva

Caracterização e expressão heteróloga de proteínas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a otimização de um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade para o diagnóstico da Linfadenite Caseosa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética

Orientadora: Dra. Núbia Seyffert

Coorientador: Prof. Dr. Vasco Azevedo

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas - ICB - UFMG

2012

043 Silva, Renata de Faria.

Caracterização e expressão heteróloga de proteínas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para a otimização de um teste intradérmico de hipersensibilidade para diagnóstico da linfadenite caseosa [manuscrito] / Renata de Faria Silva. – 2012.

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

Orientadora: Núbia Seyffert. Co-orientador: Vasco Azevedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Geral.

1. Genética – Teses. 2. *Corynebacterium pseudotuberculosis* – Teses. 3. Proteínas recombinantes – Teses. 4. Testes intradérmicos – Teses. 5. Linfadenite caseosa – Teses. I. Seyffert, Núbia II. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. IV. Título.

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



**"Caracterização e expressão heteróloga de proteínas de
Corynebacterium pseudotuberculosis para a otimização de um Teste
Intradérmico de Hipersensibilidade diagnóstico da *Linfadenite
Caseosa*."**

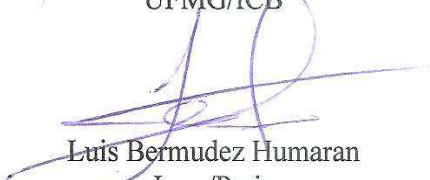
Renata de Faria Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Núbia Seyffert - Orientadora
UFMG


Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Co-Orientador
UFMG


Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem
UFMG/ICB


Luis Bermudez Humaran
Inra /Paris

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2012.

DEDICATÓRIA

A Deus, porque dEle, por meio dEle, e para Ele são todas as coisas.
Á minha família, que durante todo esse período me apoiou incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Vasco Azevedo pela oportunidade e confiança que em mim foi depositada. Ao professor Dr. Anderson Miyoshi por todas as contribuições que fez ao longo desse processo.

Um agradecimento mais que especial a minha orientadora, Dra. Núbia Seyffert, que com plena convicção, foi muito mais que uma orientadora, demonstrando total dedicação e entrega para que atingíssemos nossos objetivos. Com certeza um excelente exemplo de profissional e ser humano.

Aos colegas do LGCM que de forma direta ou indireta contribuíram para a execução desse trabalho como Thiago Castro, Rodrigo Dias, Vanessa Bastos, Wanderson Marques, Anderson Santos. Ao Alfonso, eu agradeço pelos conselhos e por todos os momentos de descontração. E a duas pessoas muitos especiais, Camila Azevedo pelos bons e maus momentos que passamos juntas e a querida Tessália Saraiva, que além de ter sido uma mentora, também foi uma amizade que conquistei e espero levar por toda a vida.

Aos meus pais que tanto amo, agradeço pelos ensinamentos ao longo de todos esses anos, pelo amor, pela confiança. Agradeço a amizade das minhas irmãs Denise e Grazielle, ao meu cunhado Sandro e a Natália, princesinha da titia. Agradeço também a família que conquistei em Belo Horizonte, tia Ilza pela generosidade; Ana Carla e Nei pela amizade e conselhos; a Fernanda, Jhonata e Neuza por todos os momentos que passamos juntos; Nilza e família, Sandra e família; Neide e família, sem deixar de destacar o Anderson pelas orações e incentivos.

E a Deus, amado da minha alma, um obrigada por tudo que realizou em minha vida e por tudo que ainda há de vir, porque sei que Seus planos e caminhos são maiores e melhores que os meus.

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva que causa a Linfadenite Caseosa (LC), uma doença infecto-contagiosa crônica que acomete pequenos ruminantes, promovendo a redução da produtividade dos animais infectados. A doença se caracteriza pela formação de abscessos em nódulos linfáticos superficiais e/ou órgãos internos. Vários métodos para o diagnóstico da LC subclínica foram desenvolvidos, porém não alcançaram eficácia e praticidade satisfatórias. Assim, nesse trabalho selecionamos seis alvos protéicos dos 104 previamente descritos, caracterizamos os produtos gênicos das *Open Reading Frame* (ORFs) e produzimos as proteínas recombinantes para a otimização de um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade (TIH) para a LC. Os insertos das seis ORFs foram amplificados após a extração do DNA genômico da linhagem 1002 de *C. pseudotuberculosis* com a utilização de iniciadores específicos, que ligados aos vetores pAE e pET-28a foram transformados em *Escherichia coli* DH5 α para a clonagem molecular. Para verificar a expressão das proteínas recombinantes, os clones foram transformados em *E. coli* C43 pLysS e a cinética de expressão realizada. Duas proteínas recombinantes foram produzidas e submetidas a *Western blot* com soros de caprinos infectados com *C. pseudotuberculosis*, demonstrando antigenicidade nesses testes preliminares. Novos testes de caracterização das proteínas recombinantes serão realizados e esperamos que as mesmas possam ser utilizadas na otimização de um TIH de elevada acurácia, para o controle da LC nos rebanhos de ovinos e caprinos.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Proteínas recombinantes, Teste Intradérmico de Hipersensibilidade, Linfadenite Caseosa.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a Gram-positive bacterium that causes caseous lymphadenitis (CLA), a chronic infectious disease that affects small ruminants, promoting the reduction of productivity of infected animals. The disease is characterized by the formation of abscesses in the lymph nodes surface and/or internal organs. Several methods for the diagnosis of subclinical CLA been developed, but have not reached satisfactory efficacy and practicability. Thus, this study selected six of the 104 proteins targets previously described, we characterize the genics products of the *Open Reading Frame (ORF)* and produce recombinant proteins for the optimization of an Intradermal Hypersensitivity Test (IHT) to LC. The inserts of the six *ORFs* were amplified after extraction of genomic DNA from strain 1002 of *C. pseudotuberculosis* with the use of specific primers which bound to vectors pAE and pET-28a were transformed into *Escherichia coli* DH5a for molecular cloning. To verify the expression of recombinant proteins, clones were transformed into *E. coli* C43 pLysS and expression kinetics performed. Two recombinant proteins were produced and subjected to *Western blot* with sera from goats infected with *C. pseudotuberculosis*, demonstrating antigenicity in these preliminary tests. New tests for characterization of recombinant proteins will be made and hopefully they can be used in the optimization of an IHT high accuracy for control of CLA in flocks of sheep and goats.

Key-words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Recombinant Proteins, Intradermal Hypersensitivity Test, Caseous Lymphadenitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Iniciadores desenhados para amplificação da <i>ORF cpsec23</i> utilizando o programa Vector NTI 8.0.....	30
Figura 2. Iniciadores desenhados para amplificação da <i>ORF cpsec32</i> utilizando o programa Vector NTI 8.0.....	30
Figura 3. Iniciadores desenhados para amplificação da <i>ORF cpsec35</i> utilizando o programa Vector NTI 8.0	31
Figura 4. Iniciadores desenhados para amplificação da <i>ORF cpsec37</i> utilizando o programa Vector NTI 8.0.	31
Figura 5. Iniciadores desenhados para amplificação da <i>ORF cpsec41</i> utilizando o programa Vector NTI 8.0	31
Figura 6. Iniciadores desenhados para amplificação da <i>ORF cpsec33</i> utilizando o programa Vector NTI 8.0.	31
Figura 7. Predições do peptídeo sinal e domínio transmembrânico da proteína secretada da <i>ORF cpsec32</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> através dos Programas SignalP 4.0 e TMHMM 2.0.	39
Figura 8. Amplificação por PCR das <i>ORFs cpsec32</i> , <i>cpsec37</i> e <i>cpsec33</i> com iniciadores específicos.....	43
Figura 9. Amplificação por PCR da <i>ORF cpsec41</i> com o uso de iniciadores específicos.....	44
Figura 10. Amplificação por PCR das <i>ORFs cpsec23</i> e <i>cpsec35</i> com o uso de iniciadores específicos.....	44
Figura 11. Representação esquemática do mapa do vetor pAE com o inserto <i>cpsec33</i>	45

Figura 12. Representação esquemática do mapa do vetor pET28a com o inserto <i>cpsec35</i>	45
Figura 13. Confirmação dos clones recombinantes <i>cpsec32/pAE</i> , <i>cpsec37/pAE</i> e <i>cpsec33/pAE</i>	46
Figura 14. Avaliação da expressão das proteínas recombinantes rCpsec32 e rCpsec37 na linhagem OverExpress™ C43(DE3) pLysS.....	48
Figura 15. Avaliação da expressão da proteína recombinante rCpsec33 na linhagem OverExpress™ C43(DE3) pLysS.....	49
Figura 16. Avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante rCpsec32 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS.....	50
Figura 17. Avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante rCpsec37 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS.....	51
Figura 18. Avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante rCpsec33 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS.....	52
Figura 19. Teste de solubilidade das proteínas recombinantes rCpsec32, rCpsec37 e rCpsec33 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS.....	53
Figura 20. <i>Western blot</i> com as proteínas recombinantes rCpsec32, rCpsec37 e rCpsec33 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS.....	54
Figura 21. <i>Western blot</i> com as proteínas recombinantes rCpsec33 e rCpsec32 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS com o soro positivo para <i>C. pseudotuberculosis</i>	55
Figura 22. <i>Western blot</i> com as proteínas recombinantes rCpsec33 e rCpsec32 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS com o soro negativo para <i>C. pseudotuberculosis</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas de restrição utilizadas para a digestão das moléculas de DNA genômico e plasmidiano.....	33
Tabela 2. Linhagens bacterianas utilizadas para clonagem molecular e expressão das proteínas recombinantes	35
Tabela 3. Nomenclatura padrão que será adotada para as <i>ORFs</i> e proteínas recombinantes.	40
Tabela 4. Análises bioinformáticas dos produtos gênicos das seis <i>ORFs</i> de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> linhagem 1002.....	41
Tabela 5. Identificação dos domínios conservados das quatro <i>ORFs</i> de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> linhagem 1002.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
BHI	Infusão cérebro-coração
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
H₂O	Água
IgG	Imunoglobulina G
kDa	<i>Kilodalton</i>
Kb	<i>Kilobase</i>
KHZ	<i>Kilohertz</i>
LB	Luria Bertani
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LGCM	Laboratório de Genética Celular e Molecular
M	Molar
MALDI-TOF/TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry</i>
mA	Miliamperes
min	Minuto
mg	Miligrama
µg	Micrograma
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
mM	Milimolar
NBT	Cloreto nitroazul tetrazólio

NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
pM	Picomolar
PVDF	Fluoreto de vinilideno
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
U	Unidade
V	Volt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Aspectos microbiológicos de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	15
1.1.1	Classe Actinobacteria.....	15
1.1.2	Propriedades morfológicas e bioquímicas	15
1.1.3	Determinantes de virulência	16
1.1.4	Exoproteínas	17
1.2	A Linfadenite Caseosa	19
1.2.1	Prevalência, transmissão e patogênese	19
1.2.2	Tratamentos e vacinas	20
1.2.3	Métodos de diagnóstico	22
1.2.3.1	Padrão-ouro	22
1.2.3.2	Testes sorológicos	22
1.2.3.3	Testes moleculares	23
1.2.3.4	Testes de hipersensibilidade	24
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Análises bioinformáticas das ORFs selecionadas.....	28
4.2	Isolamento das sequências codificadoras.....	28
4.2.1	Manipulação do DNA	28
4.2.2	Eletroforese em gel de agarose	28
4.3	Extração do DNA genômico	29
4.3.1	Determinação quantitativa e qualitativa do DNA.....	29

4.4	Reação em cadeia da polimerase	30
4.4.1	Amplificação das <i>ORFs</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	30
4.5	Clonagem molecular e expressão das proteínas recombinantes	31
4.5.1	Purificação dos insertos	31
4.5.2	Extração do DNA plasmidiano em pequena escala	32
4.5.3	Digestão enzimática	32
4.5.4	Purificação do DNA	33
4.5.5	Ligação do inserto ao vetor	33
4.5.6	Transformação bacteriana	34
4.5.6.1	Preparação das células eletrocompetentes para clonagem e expressão	34
4.5.6.2	Transformação bacteriana na linhagem de clonagem	35
4.5.7	Verificação da presença do inserto no vetor	35
4.5.7.1	Digestão do plasmídeo extraído	35
4.5.8	Transformação bacteriana nas linhagens de expressão	36
4.5.9	Produção das proteínas recombinantes me diferentes linhagens de expressão	36
4.5.10	Teste de solubilidade	37
4.5.11	<i>Western blot</i>	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Análises bioinformáticas das <i>ORFs</i>	39
5.2	Clonagem molecular e expressão das proteínas recombinantes	43
5.2.1	Amplificação das <i>ORFs</i>	43
5.2.2	Construções dos vetores com os insertos	45
5.2.3	Confirmação dos clones recombinantes	46
5.2.4	Avaliação da produção das proteínas recombinantes em diferentes linhagens de expressão	47
5.2.5	Teste de solubilidade	52
5.2.6	<i>Western blot</i>	53
5.3	Avaliação da anigenicidades das proteínas recombinantes	54

6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÕES.....	60
8	PERSPECTIVAS.....	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos microbiológicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

1.1.1 Classe Actinobacteria

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo denominado CMNR inserido na classe das actinobactérias, no qual também estão presentes *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* compartilhando características particulares tais como: a organização da parede celular baseada num grande complexo polimérico de peptidoglicano, arabinogalactano e ácido micólico, além de um alto conteúdo G+C no seu genoma (Dorella *et al.*, 2006).

C. diphtheriae, agente causador da difteria e *C. jeikeium*, microrganismo responsável por infecções nosocomiais em humanos (Tauch *et al.*, 2005) merecem destaque dentro do grupo das bactérias patogênicas. Outra espécie de destaque no gênero devido a sua importância veterinária é a *C. pseudotuberculosis*, agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC).

Desse grupo também faz parte a *Corynebacterium glutamicum*, que é uma bactéria altamente utilizada na produção de aminoácidos, como L-aspartato e L-lisina (Koffas & Stephanopoulos, 2005).

1.1.2 Propriedades morfológicas e bioquímicas

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

O crescimento de *C. pseudotuberculosis* na superfície do ágar se dá inicialmente de maneira espaçada e, posteriormente, se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme alaranjado, enquanto, que em meio líquido, desenvolve-se como depósitos granulares. As condições ótimas para seu crescimento são a 37°C em pH entre 7,0 e 7,2, e a anaerobiose é facultativa (Dorella *et al.*, 2006).

Além dessas características, *C. pseudotuberculosis* possui variações bioquímicas, principalmente quanto a suas habilidades de fermentação. Todas as linhagens produzem ácido

a partir de muitas fontes de carbono, incluindo glicose, frutose, galactose, manose e sacarose, em contrapartida não produzem gás (Merchant & Packer, 1967; Buxton & Fraser, 1977; Holt *et al.*, 1994). Essa bactéria apresenta reações bioquímicas positivas para fosfolipase D e catalase, enquanto que para oxidase demonstra resultado negativo, além disso, é beta-hemolítica (Buxton & Fraser, 1977). Em 1971, Biberstein & Hirsh utilizaram a produção de nitrato redutase como forma de 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).

1.1.3 Determinantes de virulência

O conhecimento sobre os mecanismos moleculares e as bases genéticas dos fatores de virulência de *C. pseudotuberculosis* é escasso, porém são crescentes os estudos a cerca da compreensão destes mecanismos. A exotoxina fosfolipase D (PLD) e os lipídeos da parede celular são os fatores de virulência mais bem caracterizados dessa bactéria.

A PLD, considerada como o principal fator de virulência de *C. pseudotuberculosis*, é caracterizada como uma potente exotoxina produzida por esta bactéria (Lipsky *et al.*, 1982; Hodgson *et al.*, 1999). Esta toxina atua como um fator de permeabilidade, auxiliando na hidrólise de ligações éster de fosfolipídeos da membrana de células de mamíferos, de forma a contribuir com a dispersão da bactéria do sítio inicial de infecção para os sítios secundários do hospedeiro (Carne & Onon, 1978; Coyle & Lipsky, 1982; McNamara *et al.*, 1995). A atuação da PLD na disseminação da bactéria pode ser explicada pela ação dermonecrótica que a mesma exerce danificando as células endoteliais, de maneira a promover o extravasamento de plasma dos pequenos vasos sanguíneos da derme e o acesso aos vasos linfáticos (Egen *et al.*, 1989; Songer, 1997). Além disso, essa exotoxina é considerada leucotóxica, o que contribui para as lesões e a destruição de macrófagos de caprinos durante a infecção causada por *C. pseudotuberculosis* (Tashjian & Campbell, 1983). O papel da PLD na virulência da bactéria foi evidenciado após a geração de linhagens mutantes para o gene *pld*, uma vez que não foram capazes de se disseminar e induziram uma resposta imunológica contra *C. pseudotuberculosis*, apesar de não totalmente satisfatória. A vacina Toxminus sem o gene *pld* não conferiu proteção mostrando que a PLD é importante para ajudar na resposta imune protetora de uma vacina. (Hodgson *et al.*, 1992).

Os lipídeos presentes na parede celular de *C. pseudotuberculosis* são importantes fatores para a patogênese da doença, e estão mais presentes nas linhagens mais virulentas do que nas linhagens atenuadas (Hard, 1972; Jolly, 1966). Além disso, os lipídeos estão descritos

como responsáveis pela aderência dos microrganismos e por promoverem uma citotoxicidade local, além de formarem uma camada lipídica protegendo a bactéria contra a ação degradativa das enzimas presentes no fagolisossomo do hospedeiro (Alves *et al.*, 1997). A toxicidade do material lipídico extraído foi demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias (Jolly, 1966) e, segundo Muckle & Gyles (1982) há uma relação direta entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de abscessos crônicos.

Estudos demonstraram que um grupo de genes envolvidos com a absorção de ferro tem um importante papel na virulência de *C. pseudotuberculosis* (Billington *et al.*, 2002). Os quatro genes dispostos em um operon foram identificados próximos ao gene *pld* no genoma de *C. pseudotuberculosis* e designados como genes *fag* A, B, C e D. Eles representam um importante fator de virulência por propiciarem à bactéria uma maior capacidade de sobreviver à ambientes hostis, como o intracelular. Embora não haja alteração na utilização de ferro por um mutante para *fag* B(C) *in vitro*, o mesmo apresenta uma habilidade diminuída para sobreviver e causar abscessos em cabras infectadas experimentalmente (Billington *et al.*, 2002).

Estudos relacionados ao controle da expressão gênica em *C. pseudotuberculosis* durante a infecção *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para desvendar estas vias de patogenicidade e detectar novos genes envolvidos com a virulência. Estes trabalhos estão relacionados ao estudo de fatores sigma ECF (*extracytoplasmic function*) da RNA polimerase bacteriana, cujos fatores são responsáveis pela mudança do padrão da expressão gênica da bactéria em condições de estresse, como mudanças de temperatura ou de pH (Castro, 2009; Pacheco, 2009).

1.1.4 Exoproteínas

O secretoma bacteriano compreende estudos de uma ampla gama de proteínas, como receptores, adesinas, transportadores, enzimas secretadas, toxinas e fatores de virulência, que são responsáveis pelas interações com o ambiente em que a bactéria se encontra (Hansmeier *et al.*, 2006; Hautefort *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2008). Dessa forma, as exoproteínas bacterianas são essenciais para uma série de aplicações, desde a identificação de enzimas até o entendimento da virulência do organismo (Jankovic *et al.*, 2007); já que as mesmas podem estar envolvidas na adesão, invasão, multiplicação, evasão do sistema imune e danos ao hospedeiro (Wooldridge *et al.*, 2009).

Devido à grande importância das exoproteínas na interação do patógeno com o hospedeiro, diversos estudos vêm sendo conduzidos em *C. pseudotuberculosis* com o objetivo de identificar possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico, além de caracterizar fatores de virulência que contribuem para a instalação e progressão da LC. Em 1993, Braithwaite *et.al.*, extraíram proteínas do sobrenadante de uma cultura de *C. pseudotuberculosis* e realizaram um SDS-PAGE seguido de *Western blot*, o que possibilitou a visualização de sete proteínas com pesos moleculares variando entre 14-64 kDa, das quais cinco reagiram com soros de caprinos infectados. Paule *et al.* (2004) estabeleceram um eficiente protocolo de extração de exoproteínas de *C. pseudotuberculosis* baseado na Técnica de Fracionamento em Três Fases (TPP). Essas proteínas reagiram com soros de caprinos com LC (Paule *et al.*, 2004) e também induziram uma elevada produção de interferon-gama (IFN- γ) em células sanguíneas de caprinos infectados por essa bactéria (Meyer *et al.*, 2005).

Em 2011, Seyffert *et. al.* identificaram seis exoproteínas reativas com soros de caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis* através da análise sorológica proteômica, utilizando eletroforese bidimensional (2-DE), *Western blotting* e espectrometria de massa tipo MALDI-TOF-MS/MS.

Paralelamente, Pacheco *et al.* (2011) caracterizaram o exoproteoma das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 (70 proteínas) e C231 (67 proteínas) pelo método de extração de proteínas, o TPP, seguido de espectrometria de massas TPP/LC-MS^E que resultou em 93 exoproteínas de *C. pseudotuberculosis*. Posteriormente, Silva (2011) utilizou a técnica de 2-DE associada à espectrometria de massa por MALDI-TOF-TOF para identificar 60 exoproteínas de *C. pseudotuberculosis* ampliando para 104 exoproteínas validadas experimentalmente que foram preditas anteriormente *in silico*.

Em 2011, Pacheco *et. al.*, realizou uma predição *in silico* de 95 e 107 exoproteínas das linhagens 1002 e C231 de *C. pseudotuberculosis*, respectivamente, através do *software* SurfG (Barinov *et al.*, 2009), que realiza a predição das exoproteínas baseado na presença de peptídeo sinal e de vias clássicas de secreção (*Sec*-dependente e *Sec*-independente) analisando a sequência genômica do organismo de interesse. Posteriormente foi desenvolvida uma estatística denominada *Mature Epitope Density* (MED) que quantifica o potencial de uma proteína de gerar uma resposta imune levando em consideração a quantidade de epítomos preditos na porção madura da proteína classificada como exportada (Santos *et. al.*, 2012).

1.2 A Linfadenite Caseosa

1.2.1 Prevalência, transmissão e patogênese

A LC é uma enfermidade prevalente em diversos países como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá e Brasil, onde as atividades de ovino e caprinocultura são intensas (Williamson, 2001; Arsenault *et al.*, 2003; Paton *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2009). As perdas econômicas em decorrência da doença são significativas e estão relacionadas à redução da produtividade (lã, carne e leite), eficiência reprodutiva dos animais, a condenação de carcaças e couro (Dorella *et al.*, 2006, Guimarães *et al.*, 2009).

No Brasil, o estado da Bahia, onde se concentra a maior parte do rebanho nacional de caprinos (33,7%), o prejuízo causado pela incidência da doença chega próximo de R\$ 4 milhões de reais por ano (Oliveira, 2007). Apesar do Estado de Minas Gerais (MG) possuir um rebanho reduzido, 84,3% dos produtores já relataram ter problemas como consequência da LC. Em estudos recentes, uma análise sorológica para verificar a prevalência da enfermidade em 205 propriedades de MG constatou uma elevada soropositividade de 78,9% para caprinos e 75,8% para ovinos, demonstrando a necessidade do desenvolvimento de um teste diagnóstico de detecção precoce e eficiente (Guimarães *et al.*, 2009; Seyffert *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2011).

C. pseudotuberculosis pode infectar diversos animais como cabras, ovelhas, cavalos, alpacas, lhamas, búfalos, camelos, antílopes e primatas (Baird & Fontaine, 2007). No entanto, apresenta baixo potencial zoonótico para os seres humanos, e geralmente está vinculado a atividades ocupacionais (Liu *et al.*, 2005). Em pequenos ruminantes, a transmissão de *C. pseudotuberculosis* pode ocorrer através do contato direto com as secreções e materiais contaminados pelo material caseoso de linfonodos ou de descargas nasais de animais com pneumonia contendo a bactéria. A entrada de *C. pseudotuberculosis* no hospedeiro é facilitada por lesões na pele ou ingestão de alimentos contaminados (Williamson, 2001; Dorella *et al.*, 2006). Ao invadir o hospedeiro, a bactéria é fagocitada por macrófagos não ativados, incapazes de eliminá-la, que se degenerarão (Hard, 1972). Essa incapacidade é atribuída à ausência de produção de óxido nítrico quando estimulados com componentes antigênicos de *C. pseudotuberculosis* (Bogdan *et al.* 1997). Ao resistirem ao compartimento do fagolisossomo, as bactérias infectam outros macrófagos, e com a consequente morte das células do sistema imunológico, elas são capazes de se espalharem para o linfonodo drenante

local ocasionando a formação de lesões necróticas (Jones *et al.*, 2000). Seguindo um novo ciclo de replicação, as bactérias conseguem colonizar os linfonodos e sobreviver, podendo atingir diversos órgãos e células. A disseminação dessa bactéria também envolve a ação da PLD (Airello *et al.*, 2001).

Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo ocorre à formação de granulomas (Jones *et al.*, 2000). O início dessa lesão se caracteriza pelo aparecimento de células epitelíoides substituídas posteriormente por necrose caseosa, que vai sendo circundada por células epiteliais, linfócitos e por uma camada de tecido conjuntivo fibroso, respectivamente. A formação do granuloma é crônica e se repete sucessivamente sobre a camada fibrosa, resultando no aspecto macroscópico desta patologia caracterizada por uma massa esférica laminada, como as camadas de uma cebola (Jones *et al.*, 2000).

Além disso, é considerado um processo dependente da imunidade adaptativa, que nesse caso é complexa e envolve tanto uma resposta humoral como uma resposta celular mediada por Linfócitos T (Paule, 2003). Pépin *et al.*, (1994) observaram maior quantidade de linfócitos T CD8 em granulomas presentes no sítio de inoculação quando comparados àqueles encontrados nos linfonodos drenantes. Esta subpopulação de linfócitos está relacionada com a atividade efetora/citotóxica, podendo atuar como supressora e aumentar com o amadurecimento da lesão em relação a outras subpopulações, como os CD4.

Com relação ao perfil de citocinas expressas, há prevalência das citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e IFN- γ principalmente no sítio de inoculação, sendo a última de grande importância para a ativação de macrófagos que são os responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares (Pépin *et al.*, 1997, Hodgson *et al.*, 1992, Ellis *et al.*, 1991).

1.2.2 Tratamento e vacinas

O tratamento da LC pode ser realizado através do uso de antibióticos, porém as drogas administradas não conseguem penetrar nas cápsulas dos abscessos. Uma segunda alternativa é a drenagem e extirpação dos linfonodos superficiais acometidos, que além de não se obter total êxito na eliminação das bactérias, quando linfonodos e órgãos internos estão acometidos, esta estratégia não se aplica (Williamson, 2001). A aplicação destes tratamentos pode não ser eficiente ou ocasionar a contaminação ambiental, pois um único abscesso possui uma grande

quantidade de bactérias. Diante disso, o controle e a prevenção podem ser considerados como estratégias mais viáveis (Guimarães *et al.*, 2009).

As medidas de controle incluem a identificação dos animais infectados, impedindo que os mesmos tenham contato com os animais saudáveis; assim como, procedimentos de higienização de todos os instrumentos e ambientes (galpões, troncos de tosquia e baias) para evitar a disseminação bacteriana (Williamson, 2001, Dorella *et al.*, 2006).

Considerando os fatos mencionados acima e a precariedade no manejo dos animais na maioria das propriedades (Guimarães *et al.*, 2011), a medida preventiva ideal seria a imunização (Dorella *et al.*, 2006).

Atualmente, vacinas mais eficazes contra a infecção causada por *C. pseudotuberculosis* são requeridas. No entanto, existem alguns imunógenos disponíveis no mercado nacional e internacional que apresentam aspectos relevantes a serem considerados quanto à sua utilização. Nem todas as vacinas licenciadas para ovinos têm a mesma eficiência para caprinos e, por não se adequarem a todos os casos, normalmente se faz necessário ajustar o programa de vacinação a determinado rebanho (Williamson, 2001). Vários estudos têm sido realizados, testando diferentes tipos de estratégias vacinais com o uso de bactérias vivas atenuadas, bactérias mortas, frações da parede celular, sobrenadante de cultura bacteriana, componentes celulares misturados com sobrenadantes e vacinas de DNA (LeaMaster *et al.*, 1987, Holstad, 1989, Ellis *et al.*, 1991, Eggleton *et al.*, 1991; Costa *et al.*, 2011), que alcançaram níveis variáveis de proteção.

Recentemente, Dorella *et al.* (2006), por meio de mutagênese aleatória utilizando o sistema de transposição baseado no TNFuZ, identificaram 34 mutantes de *C. pseudotuberculosis*. Através de experimentos de imunização com o mutante CP13 em camundongos, observou-se que o mesmo conferia uma proteção de 81% em modelo murino após o desafio com a linhagem selvagem, demonstrando ser um alvo promissor para a obtenção de uma nova vacina viva atenuada contra a LC (Dorella, 2009). Estes dados de proteção estão sendo confrontados com dados de testes pilotos realizados em caprinos, com o objetivo de verificar a manutenção dos índices de proteção, bem como o surgimento de possíveis efeitos colaterais ocasionados.

1.2.3 Métodos de diagnóstico

1.2.3.1 Padrão-ouro

Atualmente, o teste padrão-ouro para o diagnóstico da LC é realizado através 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 48h. 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, redução de nitrato e hidrólise de esculina e uréia) e 8 testes de fermentação de carboidratos (glucose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sucrose e glicogênio).

1.2.3.2 Testes sorológicos

Diversas estratégias sorológicas foram desenvolvidas para estabelecer um diagnóstico subclínico da LC. Um dos primeiros testes a ser desenvolvido foi o de soroneutralização em ovinos para a identificação de antitoxinas de *C. pseudotuberculosis* nesses animais (Carne, 1940). Posteriormente, surgiram os testes de soro-aglutinação que foram aperfeiçoados (Cameron & McOmie, 1940; Awad, 1960; Kestintepe, 1976; Burrel, 1978; Shigidi 1979; Lund *et al.* 1982) e alguns testes já existentes também foram sofrendo adaptações para o diagnóstico da LC, como a imunodifusão em gel (Shigidi, 1974; Burrel, 1980b; Nain *et al.* 1984), hemaglutinação indireta passiva (Shigidi, 1978), fixação de complemento (Shigidi, 1979) e inibição da hemólise em tubo (Burrel, 1980a).

Dos ensaios sorológicos desenvolvidos para o diagnóstico da LC mencionados até o momento, alguns foram comparados entre si no que diz respeito à acurácia, porém os resultados foram pouco conclusivos. Shigidi (1979) verificou que o teste de inibição da hemólise sinérgica era menos sensível do que a hemaglutinação indireta. Por outro lado, Lund *et al.* (1982) observou alta correlação entre o teste de soro-aglutinação e inibição da hemólise sinérgica.

Nos anos 80, começaram a ser empregados no diagnóstico da LC os primeiros testes ELISA para a detecção de anticorpos contra *C. pseudotuberculosis* (Shen *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 1987), sendo constatada uma maior sensibilidade quando comparado com o teste de inibição da hemólise sinérgica (Maki *et al.*, 1985). Estudos envolvendo ELISAs indiretos com componentes da célula bacteriana e exoproteínas de *C. pseudotuberculosis* foram demonstrados como sendo relativamente eficazes em programas de controle da enfermidade (Binns *et al.* 2007; Carminatti *et al.*, 2003). Com a finalidade de aprimorar a acurácia deste ensaio em relação aos demais já estabelecidos, um ELISA sanduíche com rPLD foi desenvolvido (Dercksen *et al.*, 2000).

Uma variação da técnica de ELISA, voltada para detectar IFN- γ como um marcador de imunidade mediada por células contra *C. pseudotuberculosis* também foi padronizada (Paule *et al.*, 2003; Menzies *et al.*, 2004). Esta técnica pareceu ser mais sensível do que o ELISA convencionalmente utilizado na detecção de anticorpos, além de não parecer ser afetada pela vacinação dos animais (Dorella *et al.*, 2006), o que poderia ser uma possibilidade para diagnosticar a LC de forma mais precisa, se não fosse o seu elevado custo.

1.2.3.3 Testes moleculares

Na busca por estratégias envolvendo um diagnóstico mais preciso da LC, técnicas moleculares começaram a ser aplicadas a partir de 2002. Çetinkaya *et al.*, propuseram um teste baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar isolados de *C. pseudotuberculosis* através da amplificação parcial da sequência do gene do RNA ribossômico 16S (16S rRNA), que é muito utilizado em estudos taxonômicos microbianos. Com o objetivo de avaliar a prevalência da LC em caprinos e ovinos, o teste apresentou algumas limitações, incluindo a dependência da cultura bacteriológica e a incapacidade de distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans*, podendo atribuir essa incapacidade a alta similaridade genômica entre estas duas bactérias.

Posteriormente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um ensaio de PCR multiplex para obter um diagnóstico mais rápido e eficiente. A principal vantagem deste teste foi à utilização de genes específicos para distinguir *C. pseudotuberculosis* de outras bactérias filogeneticamente similares, além de possibilitar a utilização do DNA extraído diretamente de amostras clínicas. Os genes alvos dessa reação são: 16S rRNA, que é um gene conservado em gêneros bacterianos, o *rpoB*, gene relacionado a estudos filogenéticos de microrganismos dos gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* e o gene *pld* (Pacheco *et al.*, 2007). Este teste

apresentou boa especificidade sendo capaz de distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans* e obteve uma sensibilidade de 94%, conseguindo detectar *C. pseudotuberculosis* mais rapidamente e de maneira tão específica quanto o padrão-ouro para o diagnóstico da LC (Pacheco *et al.*, 2007). No entanto, apesar deste novo método de diagnóstico ter obtido sucesso, o mesmo apresenta limitações por não detectar o microrganismo em amostras sorológicas.

Recentemente, um método para identificação de *C. pseudotuberculosis* foi padronizado baseado na análise de restrição por PCR do gene da subunidade β da RNA polimerase, sendo capaz de diferenciá-la de *Arcanobacterium pyogenes*, que produz lesões semelhantes. Este teste proporciona uma ferramenta de diagnóstico rápido e simples para a identificação de *C. pseudotuberculosis*, porém não consegue diagnosticar a doença no seu estágio subclínico (Pavan *et al.*, 2012).

1.2.3.4 Testes de hipersensibilidade

Na resposta imune mediada por células, alguns antígenos quando injetados na intraderme, induzem uma resposta inflamatória de desenvolvimento lento, denominada hipersensibilidade retardada (tipo IV), na qual ocorrem interações com as células apresentadoras de antígenos e linfócitos T. Atualmente, o uso de um teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose em bovinos e experimentalmente em caprinos e ovinos contendo como antígeno a tuberculina PPD (proteína derivada purificada) é bem padronizado (Cyrillo, 2009; Silva *et al.*, 2006; MAPA, 2004).

Vários pesquisadores realizaram estudos visando à elaboração de Testes Intradérmicos de Hipersensibilidade (TIH). Os primeiros antígenos elaborados foram filtrados de cultura de *C. pseudotuberculosis* e testados em cobaias (Cesari, 1930). Posteriormente, testes foram realizados em ovinos infectados e não infectados pelo microrganismo, demonstrando positividade entre 48 e 72h (Cassamagnaghi, 1931; Cameron & McOmie, 1940; Farid & Mahmud, 1960).

Uma pseudotuberculina baseada na tuberculina de Koch foi desenvolvida para o diagnóstico da LC ovina na Austrália (Carne, 1932), porém uma baixa especificidade nos antígenos contidos na pseudotuberculina padronizada foi observada. Costa Filho (1978) utilizou como antígenos para o TIH, uma suspensão de cultura bacteriana de *C. pseudotuberculosis* e *C. pyogenes* em caprinos com lesões típicas da LC. Renshaw *et al.* (1979) e Brown *et al.* (1986) elaboraram um alérgeno a partir de bactérias fragmentadas por

sonicação. Em seguida, Langenegger *et al.* (1987) prepararam um alérgeno com proteína hidrossolúvel extraída de bactérias lavadas de *C. pseudotuberculosis*. Alves & Olander (1999) avaliaram o uso do TIH em caprinos experimentalmente vacinados e infectados com *C. pseudotuberculosis*, porém os resultados foram condizentes com os resultados de Brown *et al.* (1986), evidenciando a necessidade de purificação dos antígenos utilizados como reagente do teste.

Apesar da praticidade e de serem potencialmente ideais para um diagnóstico subclínico da enfermidade no campo, os TIHs até então desenvolvidos, além de não possuírem sensibilidade e especificidade suficientes, ainda não apresentam uma aplicabilidade comprovada.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um teste com as exoproteínas totais de *C. pseudotuberculosis* obtidas por TPP. Através deste trabalho, as exoproteínas totais foram utilizadas na padronização de um TIH e apresentaram resultados promissores, se comparados a antígenos utilizados em outros TIHs anteriormente desenvolvidos (Antunes, 2011), porém o mesmo requer otimização.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a criação de ovinos e caprinos tem se desenvolvido amplamente nos últimos anos, e há aproximadamente 10 anos atrás as estimativas já indicavam que 30% dos rebanhos estivessem acometidos pela LC (Ribeiro *et al.*, 2001). Atualmente, poucos trabalhos epidemiológicos foram realizados para averiguar a prevalência da LC em pequenos ruminantes. Porém, estudos realizados no estado de MG, demonstram que os índices estão próximos a 80% de animais infectados (Seyffert *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2009). A LC é reconhecida como uma das principais causas de perdas econômicas significativas na caprinovinocultura (Baird & Fontaine, 2007). Como mencionado anteriormente, o tratamento da enfermidade baseado na antibioticoterapia não é eficiente (Williamson, 2001, Baird & Fontaine, 2007) e a inexistência de um método diagnóstico satisfatório para LC principalmente na fase subclínica, pode contribuir para a disseminação da doença. Nosso grupo de pesquisa tem estudado *C. pseudotuberculosis* utilizando abordagens genômicas, transcriptômicas e proteômicas com a finalidade de elucidar mecanismos de virulência e identificar candidatos para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico para a LC. A partir da abordagem proteômica, Seyffert *et al.* (2011) identificaram exoproteínas que reagiram com o soro de caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis*. As exoproteínas totais foram descritas como antigênicas após serem avaliadas com as técnicas de *Western blot* e ensaios de IFN- γ (Paule *et al.*, 2003, Paule *et al.*, 2004, Meyer *et al.*, 2005; Rebouças *et al.*, 2011). Recentemente, Antunes (2011) padronizou um TIH com as exoproteínas totais de *C. pseudotuberculosis* em rebanhos de caprinos, que obteve resultados promissores, porém o mesmo necessita de ajustes relacionados principalmente à seleção de antígenos das exoproteínas totais e obtenção desses em larga escala. Neste trabalho, nós selecionamos algumas exoproteínas de *C. pseudotuberculosis* e realizamos a expressão heteróloga das mesmas em *Escherichia.coli*. As proteínas recombinantes obtidas serão testadas para a utilização no TIH já padronizado para o diagnóstico subclínico da LC em pequenos ruminantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir proteínas recombinantes a partir da *ORFs* selecionadas que codificam exoproteínas de *C. pseudotuberculosis* e avaliar o potencial antigênico das mesmas para otimização de um TIH para o diagnóstico subclínico da LC em pequenos ruminantes.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as seis proteínas selecionadas das 104 previamente descritas de *C. pseudotuberculosis* quanto à similaridade a outras espécies bacterianas, pela presença de peptídeos sinais, motivos transmembrânicos e domínios conservados;
- Isolar as seis *ORFs* de interesse através de PCR;
- Clonar três *ORFs* no plasmídeo pAE e três *ORFs* no plasmídeo pET-28a;
- Transformar os plasmídeos nas linhagens de expressão OverExpress™ *E. coli* C41(DE3) pLysS, C41 (DE3), C43(DE3) e C43(DE3)pLysS;
- Avaliar a antigenicidade da(s) proteína(s) recombinante(s) utilizando amostras de caprinos infectados e não infectados através de ELISA, *Western blot* e Interferon-gama.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises bioinformáticas das *ORFs* selecionadas

As sequências nucleotídicas das *ORFs* selecionadas foram comparadas com todas as sequências de proteínas conhecidas, previamente depositadas em banco de dados, utilizando-se o software BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI).

O programa SignalP 4.0 foi utilizado para a predição do peptídeo sinal baseado na sequência de aminoácidos (aa), enquanto que, através do programa TMHMM 2.0 foi realizada a busca por motivos transmembrânicos e a análise de domínios conservados foi realizada pelo software *Conserved Domains* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) do NCBI.

4.2 Isolamento das sequências codificadoras

4.2.1 Manipulação do DNA

Os procedimentos de biologia molecular adotados para a manipulação do DNA plasmidiano e/ou cromossômico foram realizados baseados em métodos pré-estabelecidos (Sambrook & Russell, 2000), com algumas modificações.

4.2.2 Eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA, tanto genômico quanto o DNA plasmidiano acrescidos de 1:10 do volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 25%) foram separadas em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (Tris base 89mM pH 7.2, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM pH 8.3), contendo brometo de etídeo (0,5µg/mL). As corridas foram realizadas a 100V durante aproximadamente 1h. O gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta através do sistema de documentação fotográfica “MultDoc-it/UVP” e a foto processada pelo programa *PhotoRead*. O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de tamanho em pb 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

4.3 Extração de DNA genômico

Para a realização da extração do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* 1002, 1 colônia foi inoculada em 30mL de meio BHI e incubada a 37°C durante 48h sob agitação a 200rpm. Após este período, foi adicionada uma solução de lisozima com fenol à cultura, que foi centrifugada por 10min a 5000rpm e a 4°C (centrífuga Jouan MR23i, rotor AM 50C.13). O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuscitado em 1mL da solução I (Tris-HCl 10mM pH 7,0; EDTA 10mM pH 8,0; NaCl 300mM) e novamente centrifugado por 10min a 13000rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuscitado em 1mL de solução II (Tris-HCl 25mM pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0; NaCl 10mM) com lisozima (10mg/mL) diluída nesta mesma solução. A mistura foi transferida para um banho-maria, durante 30min a 37°C. Em seguida, foram acrescentados 50µL de sarcozyl a 30%, a mistura foi homogeneizada por 15min e incubada a 65°C durante 20min; seguida de incubação a 4°C durante 5min. Foi adicionado à mistura 1mL de 25:24:1 fenol-clorofórmico-álcool isoamílico e homogeneizado em vórtex por 7min a 13000rpm. A fase superior foi transferida para um novo tubo, adicionando novamente 1mL da solução volume de fenol-clorofórmico-álcool isoamílico. Repetiu-se o procedimento e o sobrenadante novamente foi transferido para um novo tubo. A fase superior foi retirada e colocada em novos tubos, adicionando 1mL de clorofórmio. Após a centrifugação por 7min a 13000rpm, a fase superior foi retirada e colocada em um novo tubo. Foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto e 500mM de acetato de sódio (pH 5,2), e após esta etapa, a mistura foi incubada por toda noite a -20°C e centrifugada 10min a 13000rpm. Foram acrescentados ao DNA precipitado, 1mL de etanol 70%, e a solução foi incubada a -20°C por 15min, seguindo-se de centrifugação por 15min a 13000rpm sob as mesmas condições. Descartou-se o sobrenadante e o DNA seco na estufa a 50°C. O mesmo foi ressuscitado em 20µL de água ultrapura estéril.

4.3.1 Determinação quantitativa e qualitativa do DNA

Todas as amostras de DNA foram avaliadas quanto a sua concentração e pureza através da leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (Eppendorf), no comprimento de onda de 260nm, e também pela resolução eletroforética em gel de agarose a 1% conforme descrito no item 4.2.2.

4.4 Reação em cadeia da polimerase

4.4.1 Amplificação das *ORFs* de *C. pseudotuberculosis*

A PCR foi utilizada para o isolamento das *ORFs* selecionadas para clonagem e expressão das proteínas recombinantes. Para tal finalidade, os iniciadores utilizados na reação foram sintetizados de acordo com as sequências codificadoras dos genes identificados nas análises *in silico*, com exclusão da região que codifica o peptídeo sinal (Figuras 1-6). Em cinza estão os sítios de restrição das enzimas e em amarelo, as sequências a partir das quais o anelamento ocorrerá nas sequências codificadoras das *ORFs*.

As seis reações de amplificação para cada *ORF* de interesse foram realizadas em um volume final de 25µL cada, contendo 1,5µL (130ng/µL) do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002, 1µL (10pM/µL) do *primer* forward e 1µL (10pM/µL) do reverse, 1µL de dNTPs (10mM), 1µL de MgSO₄ (50mM), 0,2µL *Platinum*[®] Taq DNA *Polymerase* (Invitrogen), 2,5µL de enhancer, 2,5µL de tampão de amplificação 10X e 14,3µL de água ultrapura estéril. A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador ATC 401 (NyxTECHNIK). Em seguida, 1/10 do volume de cada amostra foi analisada em gel de agarose 1% (item 4.2.2.).

```
Forward – 5' GGAATTCCATATGGTTGAGCAACCAAGCAACACGA 3'  
Reverse – 5' CCGCTCGAGTAGTAGGATGTTAAGGGCTCGCAA 3'
```

Figura 1. Iniciadores desenhados para amplificação da *ORF cpsec23* utilizando o programa Vector NTI 8.0.

```
Forward – 5' CGGGGATCCAGCCAGTGCTTCAGGTC 3'  
Reverse – 5' CCCAAGCTTTTATTTTTGTACCGCTTGCTC 3'
```

Figura 2. Iniciadores desenhados para amplificação da *ORF cpsec32* utilizando o programa Vector NTI 8.0.

Forward – 5' GGAATTCCATATGGCTGATGATGTTGAATCCCTTATTAGC 3'
Reverse – 5' CGGAATTC TTATTAGTAACGGCGAGCTCCATAAAAAGG 3'

Figura 3. Iniciadores desenhados para amplificação da *ORF cpsec35* utilizando o programa Vector NTI 8.0.

Forward – 5' CGCGGATCCATTCCCTATACCGACCCAGA 3'
Reverse – 5' GGCGAATTC TACCGTGACGTCCGCG 3'

Figura 4. Iniciadores desenhados para amplificação da *ORF cpsec37* utilizando o programa Vector NTI 8.0.

Forward – 5' CTAGCTAGCGAAGAACTGTTAGCAAGTGAGATTGCTTCTG 3'
Reverse – 5' CTAGCTAGCGAAGAACTGTTAGCAAGTGAGATTG 3'

Figura 5. Iniciadores desenhados para amplificação da *ORF cpsec41* utilizando o programa Vector NTI 8.0.

Forward – 5' CGCGGATCCGGGCCTCGCGACTGG 3'
Reverse – 5' CCGGAATTC TTACCAGGCGTTCATAACGT 3'

Figura 6. Iniciadores desenhados para amplificação da *ORF cpsec33* utilizando o programa Vector NTI 8.0.

4.5 Clonagem molecular e expressão das proteínas recombinantes

4.5.1 Purificação dos insertos

Os insertos amplificados (item 4.4.2.) foram dialisados em uma membrana em éster de celulose, 0,025µm de poro, 25mm de diâmetro (Millipore) por 30min sobre água ultrapura estéril contida em uma placa de petri.

4.5.2 Extração do DNA plasmidiano em pequena escala

Os plasmídeos foram extraídos após a transferência de 1,5mL de um cultivo por toda noite para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL e centrifugados por 2min a 14000rpm. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o precipitado com 200µL de solução I (50 mM de glicose; 25mM de Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; H₂O q.s.p. 10mL) acrescido de 1,5µL de RNase. Após a mistura ser incubada por 5min a temperatura ambiente, adicionou-se 200µL de solução II (1% de SDS; 0,2M de NaOH, H₂O q.s.p. 5mL) homogeneizando lentamente ao inverter o tubo por 10 a 15 vezes. Duzentos microlitros de solução III (5M de acetato de potássio; 11,5mL de ácido acético glacial; 100mL de H₂O q.s.p.) foi adicionada e uma centrifugação realizada por 7min a 14000rpm. Logo após, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e 420µL de isopropanol foram adicionados e as amostras homogeneizadas por inversão (10 a 15 vezes). A mistura foi resfriada a – 20°C por 30min e centrifugada a 14000rpm por 15min. O sobrenadante foi removido, o precipitado lavado com 500µL de etanol 70% invertendo o tubo de 3 a 4 vezes e realizada uma centrifugação por 5min a 14000rpm descartando novamente o sobrenadante. Finalmente, secou-se o precipitado completamente e ressuspendeu-se em 30µL de água ultrapura estéril. Após a extração, 1/10 do volume total de DNA extraído foi aplicado em gel de agarose a 1%, sendo a corrida eletroforética analisada e documentada como descrito no item 4.2.2.

4.5.3 Digestão enzimática

Os amplicons dialisados foram submetidos à digestão com enzimas de restrição seguindo as instruções do fabricante (Tabela 1). Cada reação foi realizada para um volume final de 30µL para o produto de amplificação da *ORF* de interesse e também para o DNA plasmidiano.

Tabela 1. Enzimas de restrição utilizadas para a digestão das moléculas de DNA genômico e plasmidiano.

ORF/Vetor	Enzima de restrição
<i>cpsec23/pET28a</i>	<i>NdeI</i> (BioLabs), <i>XhoI</i> (Invitrogen)
<i>cpsec32/pAE</i>	<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> (BioLabs)
<i>cpsec35/pET28a</i>	<i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i> (BioLabs)
<i>cpsec37/pAE</i>	<i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> (BioLabs)
<i>cpsec41/pET28a</i>	<i>NheI</i> (BioLabs), <i>XhoI</i> (Invitrogen)
<i>cpsec33/pAE</i>	<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> (BioLabs)

4.5.4 Purificação do DNA

Após a reação de digestão, os amplicons e os vetores foram purificados segundo as instruções especificadas pelo *Kit* comercial *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) para eliminar os resíduos da digestão enzimática. Em seguida, os fragmentos foram quantificados através da resolução eletroforética em gel de agarose a 1% utilizando o marcador GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, 250-10,000 bp (Fermentas).

4.5.5 Ligação do inserto no vetor

O vetor pAE e o inserto foram submetidos a uma reação de ligação contendo aproximadamente 2U de T4 DNA ligase e 1µL do tampão de ligação 10X (Promega) com 6,3µL do inserto *cpsec32* (15ng/µL) mais 2,4µL do vetor (40ng/µL) em um volume total de 15 µL. A reação foi incubada a 4°C por toda a noite. Para a ligação dos insertos *cpsec37* e *cpsec33* no vetor, foram realizadas as mesmas condições utilizando-se 5,4µL do inserto *cpsec37* (20ng/µL) mais 2,7µL do vetor (40ng/µL) e 6,5µL do inserto *cpsec33* (15ng/µL) mais 2,4µL do vetor (40ng/µL).

4.5.6 Transformação bacteriana

4.5.6.1 Preparação das células eletrocompetentes para clonagem e expressão

Para a preparação das células eletrocompetentes, 100 μ L de cada linhagem de interesse (Tabela 2) foi inoculada em 5mL de meio LB (separadamente) e incubada durante 18h a 37°C sob agitação de 150rpm. No dia seguinte, 3mL de cada cultura foram diluídos em 300mL de LB (separadamente) e incubou-se a 37°C sob agitação até atingir absorbância (DO_{600nm}) de 0.2-0.3. Uma vez alcançado o crescimento desejado, as culturas foram deixadas no gelo por 30min. Depois deste período, dividiu-se as culturas em 6 tubos de 40mL cada e foi realizada uma centrifugação de 4000rpm durante 20min a 4°C, em que o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em solução estéril de glicerol 10% no volume de 40mL. Uma nova centrifugação foi realizada a 4000rpm durante 20min a 4°C. Na segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o precipitado dos tubos 5 e 6 ressuscitado em 20mL de glicerol 10%. Em seguida, o conteúdo foi dividido nos outros 4 tubos (10mL cada), o precipitado ressuscitado e mais glicerol 10% adicionado até completar-se 40mL cada, para nova centrifugação a 4000rpm durante 20min a 4°C. Na terceira lavagem, ao descartar o sobrenadante, foi adicionado 10mL de glicerol 10% nos tubos 3 e 4 ressuscitando o precipitado; após, o conteúdo foi transferido para os tubos 1 e 2 e adicionado mais glicerol 10% até completar-se 20mL cada, centrifugando a 4000rpm durante 20min a 4°C. Na última lavagem, após o sobrenadante ser descartado, 10mL de glicerol 10% foram adicionados no tubo 2, o precipitado ressuscitado e transferiu-se para o tubo 1 ressuscitando bem, finalmente centrifugou-se a 4000rpm durante 20min a 4°C. Após a última lavagem, as bactérias foram ressuscitadas em 1mL de solução glicerol 10%. Esse 1mL foi dividido em alíquotas de 100 μ L que foram estocadas a -80°C. As cinco linhagens foram preparadas em dias diferentes.

Tabela 2. Linhagens bacterianas utilizadas para clonagem molecular e expressão das proteínas recombinantes.

Nome das linhagens	Genótipo das linhagens de clonagem e expressão
<i>E. coli</i> DH5 α	endA1, hsdR17 (rk- mk+), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Na 1r), relA1, Δ (lacZYA-argF)U169(m80lacZ Δ M15)
OverExpress™ C41 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
OverExpress™ C41(DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)
OverExpress™ C43(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)
OverExpress™ C43(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)

4.5.6.2 Transformação bacteriana na linhagem de clonagem

Os produtos de ligação (inserto e vetor pAE) na quantidade de 5 μ L foram transformados em 100 μ L da linhagem de clonagem *E. coli* DH5 α . As eletrotransformações foram realizadas utilizando 2500V com um eletroporador *Gene Pulser Xcell™ Total System* (Biorad). Após este tratamento, foram adicionados 1mL de meio LB, sem antibiótico, para cada alíquota de células transformadas. Depois da eletrotransformação, as bactérias foram incubadas por 2h a 37°C. Em seguida, foram plaqueados 200 μ L em meio LB ágar suplementado com ampicilina (30 μ g/mL) e incubados a 37°C durante 18h.

4.5.7 Verificação da presença do inserto no vetor

A presença do inserto e o tamanho do fragmento de DNA clonado no vetor pAE foi verificado realizando-se a extração do plasmídeo em pequena escala conforme o item 4.5.2., seguido de digestão enzimática.

4.5.7.1 Digestão do plasmídeo extraído

A integridade do inserto no vetor foi verificada nos plasmídeos extraídos através da Miniprep (item 4.5.2.). Para isso os plasmídeos foram digeridos com as enzimas descritas na

Tabela 1. A reação de digestão do plasmídeo *cpsec32/pAE* foi realizada com 5µL de plasmídeo, 2µL de tampão 1X NEBuffer 3 (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂ e 1mM de Dithiothreitol), 1µL de *EcoRI* (20U/µL), 1µL de *BamHI* (20 U/µL), e 1µL de água ultrapura estéril, e posteriormente incubada em banho-maria a 37°C por toda a noite. Para a digestão do plasmídeo *cpsec37/pAE* utilizou-se 5µL de plasmídeo, 2µL de tampão 1X NEBuffer 2 (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂ e 1mM de Dithiothreitol), 1µL de *HindIII* (20U/µL), 1µL de *BamHI* (20 U/µL), e 1µL de água ultrapura estéril. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por toda a noite. Enquanto que para a reação de digestão do plasmídeo *cpsec33/pAE* utilizou-se 5µL de plasmídeo, 2µL de tampão 1X NEBuffer 3 (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂ e 1mM de Dithiothreitol), 1µL de *EcoRI* (20U/µL), 1µL de *BamHI* (20 U/µL), e 1µL de água ultrapura estéril; da mesma forma a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por toda a noite. As bandas foram visualizadas de acordo com o item 4.2.2.

4.5.8 Transformação bacteriana nas linhagens de expressão

Os plasmídeos provenientes da extração do DNA plasmidiano em pequena escala para confirmação dos clones, foram utilizados na quantidade de 5µL e transformados em 100µL das quatro linhagens de expressão *OverExpress™* (Tabela 1). As eletrotransformações foram realizadas utilizando 2500V com um eletroporador *Gene Pulser Xcell™ Total System* (Biorad). Após este tratamento, foram adicionados 1mL de meio LB, sem antibiótico, para cada alíquota de células transformadas. Depois da eletrotransformação, as bactérias foram incubadas por 2h a 37°C. Em seguida, foram plaqueados 200µL em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100µg/mL) e incubados a 37°C durante 18h. Após esse período algumas colônias foram cultivadas e armazenadas na proporção 1:4 da solução de glicerol 80% a -80°C.

4.5.9 Produção das proteínas recombinantes em diferentes linhagens de expressão

Para o experimento piloto de expressão, 5µL de cada clone congelado (item 4.5.7.) e de cada linhagem contendo somente o plasmídeo fechado foi inoculada em 5mL de meio de cultura LB com (100µg/mL) ampicilina. As culturas foram incubadas a 150rpm a 37°C durante 18h. No dia seguinte, 1mL de cada cultura foi inoculada em 10mL de meio LB

suplementado com (100µg/mL) ampicilina. Após atingir a densidade ótica de 0,5-0,7 (DO_{600nm}), 500µL de cada cultura foi transferido para um microtubo de 1,5mL e centrifugado por 2min a 14000rpm para ser utilizado como amostra de tempo 0 não induzido. Em seguida, as culturas foram divididas em dois tubos, cada um contendo 4,5mL das culturas, uma induzida a uma concentração final de 1mM/mL de Isopropilthio-β-D-galactopyranoside (IPTG) e a outra sem nenhum tipo de indução. Para avaliar a cinética de expressão, 500µL de cada amostra foi coletada a cada hora durante 5h. Essas amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 2min e o precipitado reservado para a análise da expressão da proteína recombinante. A lise desse precipitado celular foi realizada adicionando-se 500µL de PBS1X através de sonicação com um programa de três ciclos de 10s à 20KHZ com intervalos de 10s entre esses ciclos.

As amostras coletadas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras (SDS-PAGE), utilizando-se gel de separação a 12% (Sambrook & Russell, 2000). As amostras aplicadas no gel foram provenientes de culturas centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em 20µL de Tampão de Amostra (0,0625M Tris-HCl pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.0005%, β-mercaptoetanol 2,5%), e em seguida aquecidas a 100°C por 10min. A corrida eletroforética foi realizada em Tampão Tris-glicina (25mM Tris base, pH 8.3, 250mM Glicina e SDS 0.1%) a 150V. O gel foi incubado sob agitação a temperatura ambiente por 3h na solução corante (Metanol 50%, ácido acético 10%, e Comassie Brilliant Blue G-250 0.25%). Em seguida, descorado com uma solução descorante (Metanol 30%, ácido acético 10% e H₂O q.s.p. 1L) até que o padrão de bandas pudesse ser visualizado.

4.5.10 Teste de solubilidade

Para o teste de solubilidade das proteínas recombinantes, as células foram lisadas por sonicação em tampão PBS 1X em 3 ciclos de 10s à 20KHZ com intervalos entre esses ciclos de 10s também. Após esse processo, as amostras foram centrifugadas por 2min a 14000rpm e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. Em seguida, foi adicionado 40µL do Tampão de Amostra (0,0625M Tris-HCl pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.0005%, β-mercaptoetanol 2,5%) no precipitado e 30µL de Tampão de Amostra em 20µL do sobrenadante, posteriormente para serem fervidas a 100°C por 10min. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras (SDS-PAGE),

utilizando-se gel de separação a 12% (Sambrook & Russell, 2000). A corrida eletroforética foi realizada em Tampão Tris-glicina (25mM Tris base, pH 8.3, 250mM Glicina e SDS 0.1%) a 150V. O gel foi incubado sob agitação à temperatura ambiente por 3h na solução corante (Metanol 50%, ácido acético 10%, e Comassie Brilliant Blue G-250 0.25%). Em seguida, o gel foi descorado com uma solução descorante (Metanol 30%, ácido acético 10% e H₂O q.s.p. 1L) até que o padrão de bandas pudesse ser visualizado.

4.5.11 Western blot

Após a resolução eletroforética das frações protéicas, as mesmas foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham) por 1h em um equipamento *Owl* com a fonte ajustada para diferença de potencial elétrico (DDP) = 5V e corrente (C) = 300mA. As membranas foram incubadas por 30min em um agitador com 10mL da solução de bloqueio do *Western Breeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen), e lavadas com 20mL de água destilada durante 5min. Em seguida, a membrana foi incubada por 1h com anticorpos monoclonais anti-histidina na diluição 1:5000 (Sigma) e lavada por 5min com a solução de lavagem do *kit*, repetindo o processo três vezes. Após esse período, o anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina foi adicionado e 30min após, a membrana foi lavada com 20mL de solução de lavagem do *kit* durante 5min, repetindo o processo três vezes. A revelação foi realizada com a solução cromógena de BCIP/NBT do *Western Breeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen).

A mesma metodologia foi adotada para a realização da caracterização quanto à antigenicidade das proteínas recombinantes, sofrendo apenas algumas alterações. Para o anticorpo primário, foram adicionados soros de animal infectado por *C. pseudotuberculosis* e não infectado na diluição de 1:1000, e quanto ao anticorpo secundário, foi utilizado uma diluição de 1:4000 de um anti-IgG de caprino.

5 RESULTADOS

5.1 Análises bioinformáticas das ORFs

Para melhor compreensão, será adotada uma nomenclatura padrão para as ORFs e proteínas recombinantes (Tabela 3).

Os resultados do *blastx*, domínios conservados, motivos transmembrânicos e peptídeo sinal estão apresentados na Tabela 4. A presença de peptídeo sinal e motivo transmembrânico analisados da ORF *cpsec37* podem ser observados na Figura 7. O detalhamento dos domínios conservados encontrados nas ORFs, assim como, as diferentes espécies bacterianas que apresentam os mesmo domínios estão expostos na Tabela 5.

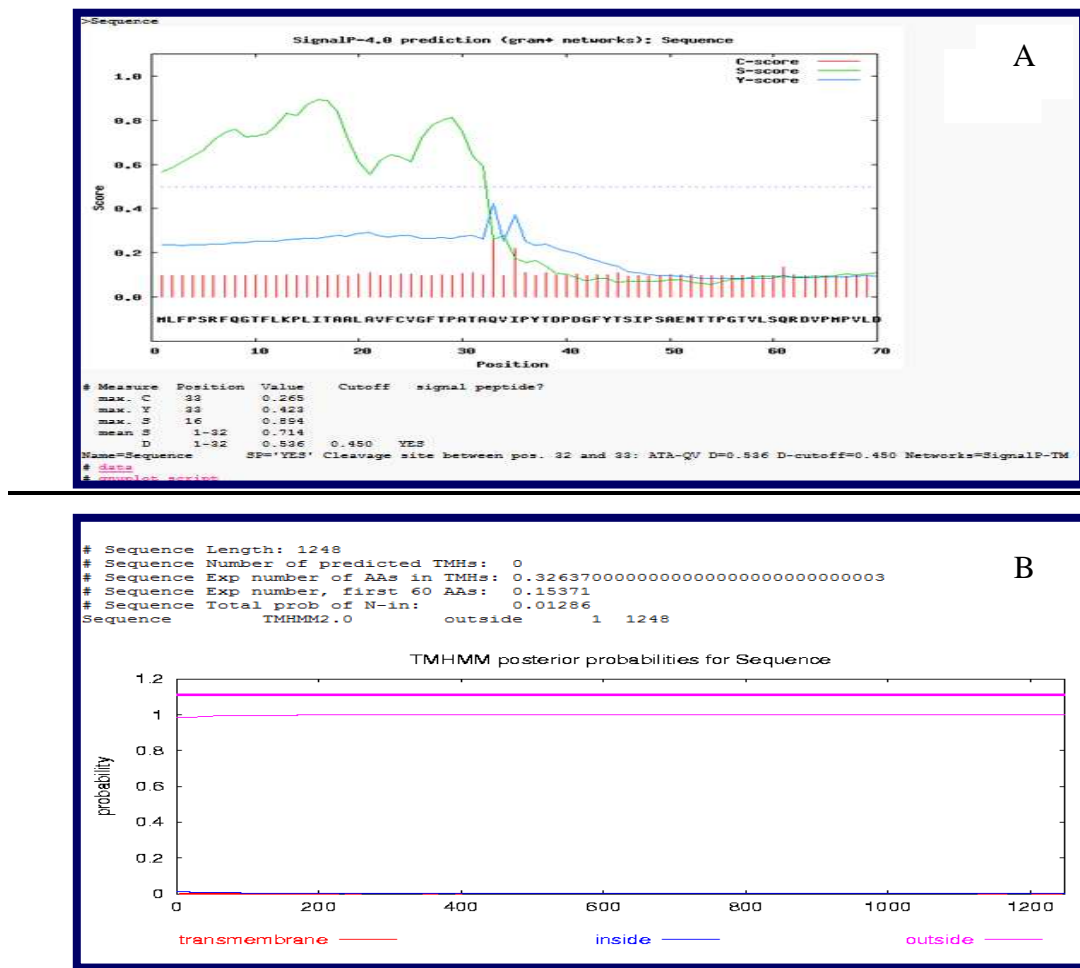


Figura 7. A) Predição do peptídeo sinal da proteína secretada codificada pela ORF *cpsec37* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através do programa SignalP 4.0. B) Predição do domínio transmembrânico da proteína secretada codificada pela ORF *cpsec37* através do programa TMHMM 2.0. Estas análises também foram realizadas para as demais ORFs.

Tabela 3. Nomenclatura padrão que será adotada para as *ORFs* e proteínas recombinantes.

Identificação das <i>ORFs</i>	Nome das <i>ORFs</i> clonadas	Produtos gênicos preditos	Referência no banco de dados	Nome das proteínas recombinantes produzidas
Cp1002_0369	<i>cpsec32</i>	<i>PAP2 superfamily protein</i>	-	rCpsec32
Cp1002_1802	<i>cpsec37</i>	<i>Secretory lipase</i>	ADL21667	rCpsec37
Cp1002_1957	<i>cpsec33</i>	<i>Trehalose corynemycolyl transferase B</i>	ADL21814	rCpsec33
Cp1002_0126	<i>cpsec23</i>	<i>Hypothetical protein</i>	ADL20032	rCpsec23
Cp1002_1416	<i>cpsec35</i>	<i>NlpC/P60</i>	ADL21293	rCpsec35
Cp1002_1868	<i>cpsec41</i>	<i>Hypothetical protein</i>	ADL21729	rCpsec41

Tabela 4. Análises bioinformáticas dos produtos gênicos das seis *ORFs* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* linhagem 1002.

<i>ORFs</i>	Peptídeo Sinal ¹	Motivos transmembrânicos ²	Domínios conservados ³	Similaridade a produtos gênicos de outras espécies bacterianas ⁴
<i>cpsec32</i>	P	A	P	<i>Corynebacterium ulcerans</i> <i>Corynebacterium jeikeium</i> <i>Corynebacterium kroppenstedtii</i> <i>Corynebacterium resistens</i> <i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> <i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> <i>Corynebacterium striatum</i> <i>Corynebacterium bovis</i> <i>Corynebacterium genitalium</i>
<i>Cpsec37</i>	P	A	P	<i>Corynebacterium ulcerans</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Corynebacterium urealyticum</i> <i>Corynebacterium jeikeium</i> <i>Corynebacterium resistens</i>
<i>Cpsec33</i>	P	A	P	<i>Corynebacterium ulcerans</i> <i>Corynebacterium diphtheria</i> <i>Corynebacterium efficiens</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Corynebacterium lipophiloflavum</i> <i>Corynebacterium genitalium</i> <i>Corynebacterium accolens</i>
<i>Cpsec23</i>	P	A	A	<i>Corynebacterium ulcerans</i> <i>Corynebacterium diphtheria</i> <i>Bacteroides faecis</i> <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
<i>Cpsec35</i>	P	A	P	<i>Corynebacterium ulcerans</i> <i>Corynebacterium diphtheria</i>
<i>Cpsec41</i>	P	A	A	-

P: presente/possui; A: ausente; 1: Análises realizadas através do SignalP; 2: Análises realizadas usando TMHMM; 3: Análises realizadas utilizando o *Conserved Domains* (NCBI); 4: Análises realizadas através do Blastx (NCBI)

Tabela 5. Identificação dos domínios conservados das quatro *ORFs* de *Corynebacterium pseudotuberculosis* linhagem 1002.

<i>ORFs</i>	Domínios conservados ¹	Espécies bacterianas que apresentam os mesmos domínios conservados
<i>Cpsec32</i>	Fosfatase ácida PAP2	<i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Corynebacterium jeikeium</i>
	Fosfolípídeo fosfatase associado à membrana	<i>Escherichia coli</i>
<i>csec35</i>	Família NlpC/P60 Hidrolases associadas à parede celular	- -
<i>Cpsec37</i>	Lipase secretada	--
<i>Cpsec33</i>	Superfamília de esterases e lipases	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i>

1: Análises realizadas utilizando o *Conserved Domains* (NCBI).

5.2 Clonagem molecular e expressão das proteínas recombinantes

5.2.1 Amplificação das *ORFs*

Através da reação de PCR com iniciadores específicos, as *ORFs* foram amplificadas sem as regiões que codificam para o peptídeo sinal a partir da amostra do DNA genômico de *C. pseudotuberculosis*. As sequências amplificadas para as *ORFs* *cpsec32* com cerca de 882pb, *cpsec37* com uma amplificação na altura de 1019pb, *cpsec33* com aproximadamente 915pb, *cpsec41* com 1092pb, *cpsec23* com cerca de 594pb e *cpsec35* com 939pb podem ser visualizadas em gel de agarose 1% nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente. Nas Figuras 9 e 10 foi utilizada a amplificação do gene 16S como controle positivo, com uma banda próxima a 816pb.

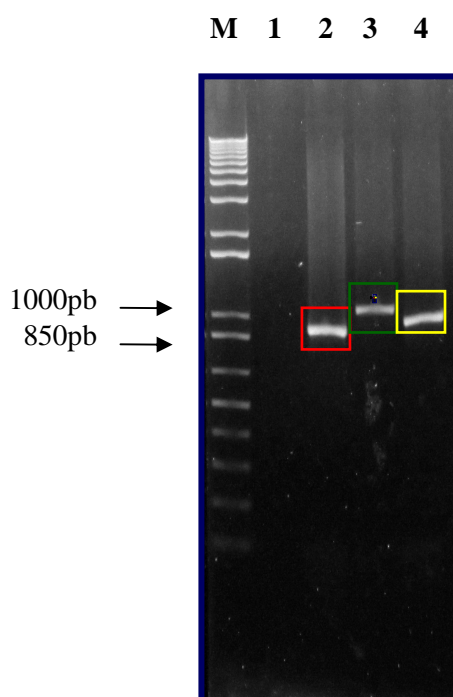


Figura 8. Amplificação por PCR das *ORFs* *cpsec32*, *cpsec37* e *cpsec33* com iniciadores específicos. Coluna M: Padrão de tamanho em pb 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) com as bandas de 1000pb e 850pb indicadas pelas setas; Coluna 1: Controle negativo; Coluna 2: Amplificação da *cpsec32* destacado pelo quadro vermelho; Coluna 3: *cpsec37* amplificado e destacado pelo quadro verde; Coluna 4: Amplificação da *cpsec33* destacado pelo quadro amarelo.

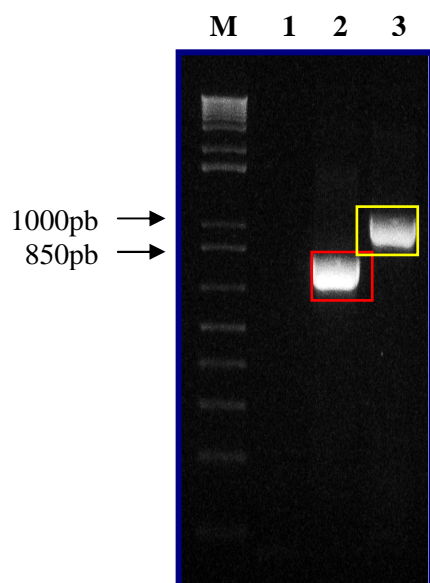


Figura 9. Amplificação por PCR da *ORF cpsec41* com o uso de iniciadores específicos. Coluna M: Padrão de tamanho em pb 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) com as bandas de 1000pb e 850pb indicadas pelas setas; Coluna 1: Controle negativo; Coluna 2: Controle positivo destacado pelo quadro vermelho; Coluna 3: *cpsec41* amplificado e destacado pelo quadro amarelo.

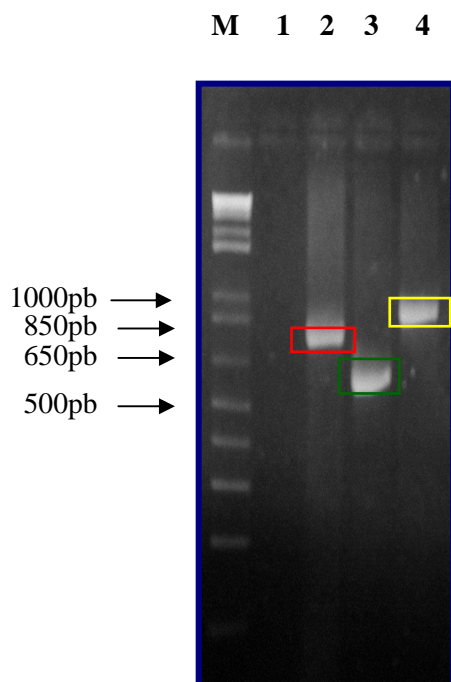


Figura 10. Amplificação por PCR das *ORFs cpsec23* e *cpsec35* com o uso de iniciadores específicos. Coluna M: Padrão de tamanho em pb 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) com as bandas de 1000pb, 850pb, 650pb, 500pb indicadas pelas setas; Coluna 1: Controle negativo; Coluna 2: Controle positivo destacado pelo quadro vermelho; Coluna 3: *cpsec23* amplificado e destacado pelo quadro verde; Coluna 4: Amplificação da *cpsec35* destacado pelo quadro amarelo.

5.2.2 Construções dos vetores

O plasmídeo *cpsec33/pAE* (Figura 11) foi construído através das análises realizadas no programa Vector NTI 8, assim como o plasmídeo *cpsec35/pET28a* (Figura 12). Esse processo também foi realizado para as demais *ORFs*.

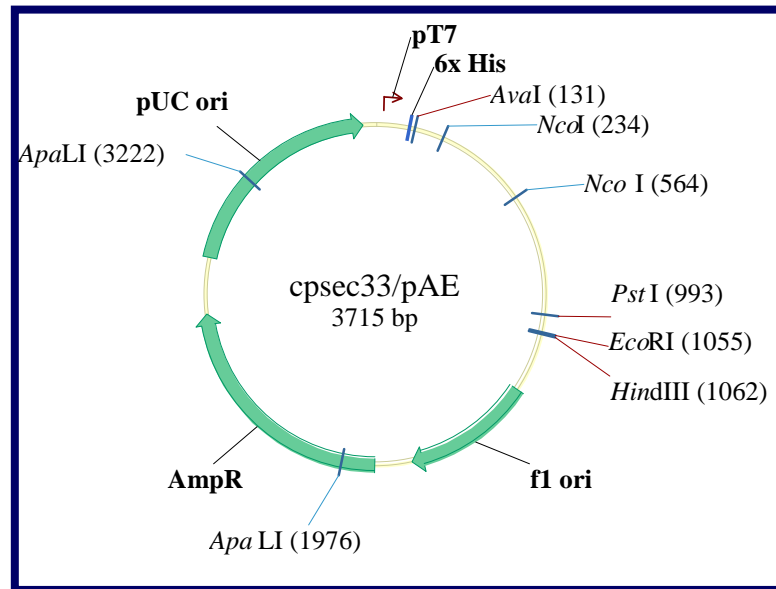


Figura 11. Representação esquemática do mapa do vetor pAE com o inserto *cpsec33*.

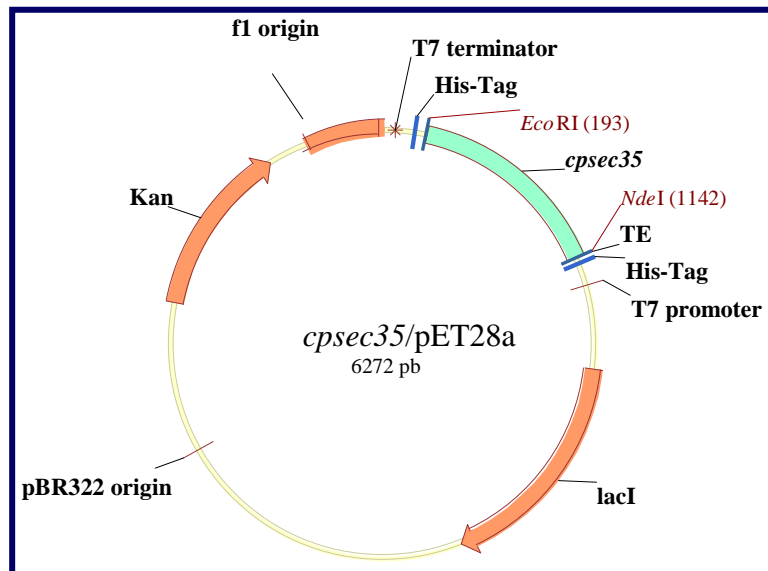


Figura 12. Representação esquemática do mapa do vetor pET28a com o inserto *cpsec35*.

5.2.3 Confirmação dos clones recombinantes

Para verificar a presença e o tamanho dos fragmentos de DNA clonados no vetor pAE, foi realizada a confirmação dos clones recombinantes *cpsec32/pAE*, *cpsec37/pAE* e *cpsec33/pAE* através de digestão com o uso das enzimas *Bam*HI, *Eco*RI; *Bam*HI, *Hind*III e *Bam*HI, *Eco*RI, respectivamente. (Figura 13). Após a digestão enzimática, foi possível verificar a partir do clone *cpsec32/pAE* digerido um inserto liberado com cerca de 882pb, do clone *cpsec37/pAE* a liberação de um inserto com aproximadamente 1019pb, e do clone *cpsec33/pAE* digerido um inserto liberado com cerca de 915pb.

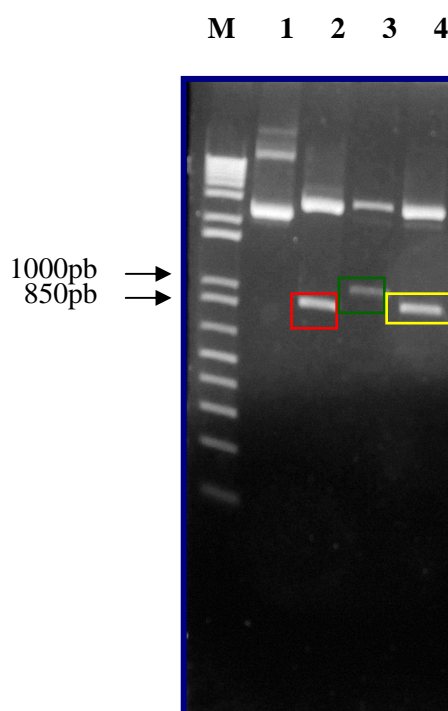


Figura 13. Confirmação dos clones recombinantes *cpsec32/pAE*, *cpsec37/pAE* e *cpsec33/pAE*. Visualização em gel de agarose 1%. Coluna M: Padrão de tamanho em pb 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) com as bandas de 1000pb e 850pb indicadas pelas setas; Coluna 1: Vetor pAE não digerido; Coluna 2: Plasmídeo *cpsec32/pAE* digerido com inserto destacado pelo quadro vermelho; Coluna 3: Plasmídeo digerido *cpsec37/pAE* com inserto destacado pelo quadro verde; Coluna 4: Plasmídeo *cpsec33/pAE* digerido com inserto destacado pelo quadro amarelo.

5.2.4 Avaliação da produção das proteínas recombinantes em diferentes linhagens de expressão

A partir dos experimentos parciais de confirmação da presença do inserto no vetor, os plasmídeos foram transformados nas linhagens de expressão (Tabela 2) e, posteriormente, as colônias foram selecionadas para os experimentos de indução da expressão gênica. A avaliação da produção das proteínas recombinantes foi realizada em 4 linhagens de expressão de *E. coli* como citado acima, utilizando 1mM/mL de IPTG. Porém, como não houve diferenças significativas de expressão entre elas, a linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS foi a escolhida. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes e uma banda apresentando o peso molecular esperado de 33 kDa, que corresponde a proteína rCpsec33 de *C. pseudotuberculosis* foi visualizada nas amostras originadas das linhagens C43(DE3)pLysS transformadas de culturas induzidas e não induzidas (Figura 15). As bandas referentes às proteínas recombinantes rCpsec32 com peso molecular esperado de 32 kDa e da rCpsec37, com peso molecular esperado de 37 kDa não foram visualizadas (Figura 14) indicando uma baixa expressão ou até mesmo a não ocorrência de expressão das mesmas. Nessas mesmas imagens, o marcador de peso molecular não pôde ser visualizado no gel após foto documentação, portanto, a banda de aproximadamente 35kDa está indicada pela seta.

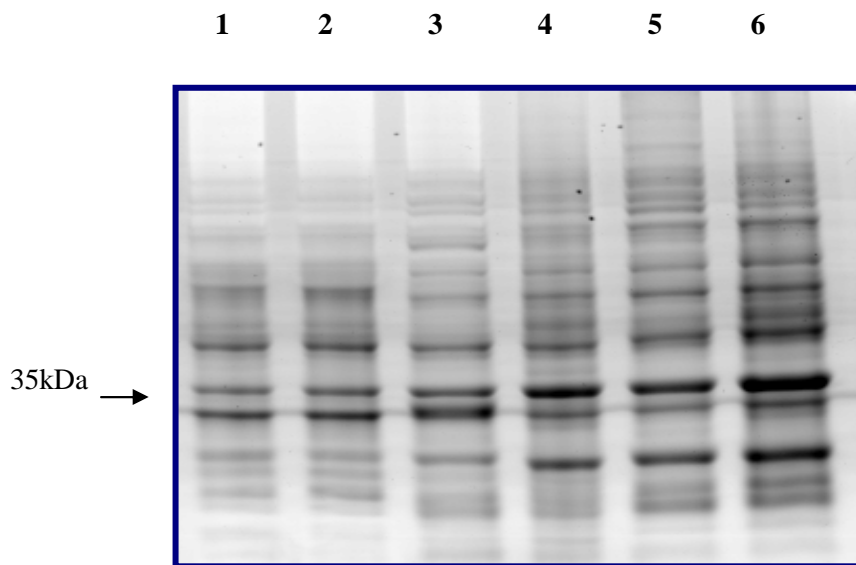


Figura 14. Avaliação da expressão das proteínas recombinantes rCpsec32 e rCpsec37 na linhagem OverExpress™ C43(DE3) pLysS no tempo de 5h. Coluna 1: Linhagem C43(DE3)pLysS transformada apenas com o plasmídeo pAE não induzido; Coluna 2: Linhagem C43(DE3)pLysS transformada apenas com o plasmídeo pAE induzido; Coluna 3: Plasmídeo *cpsec32*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS não induzido; Coluna 4: Plasmídeo *cpsec32*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS induzido; Coluna 5: Plasmídeo *cpsec37*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS não induzido; Coluna 6: Plasmídeo *cpsec37*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS induzido.

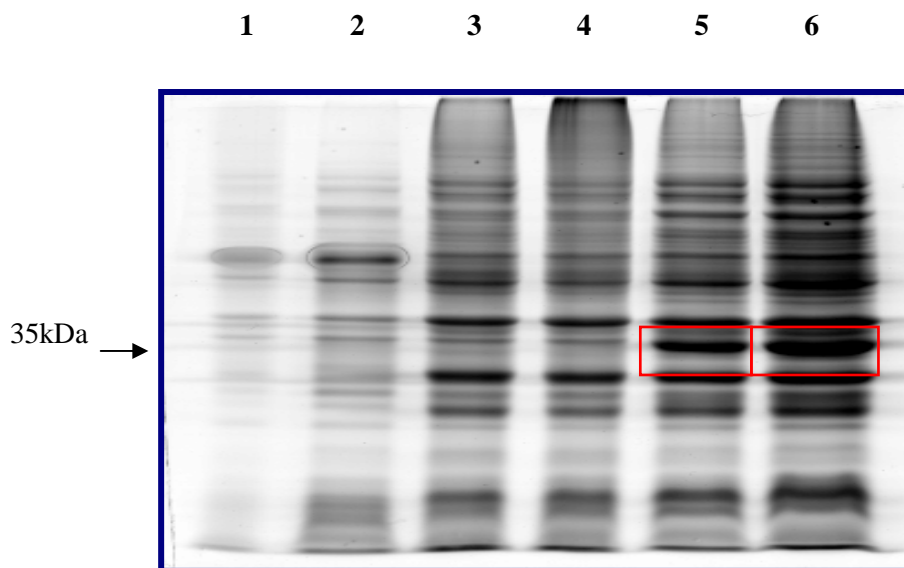


Figura 15. Avaliação da expressão da proteína rCpsec33 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS no tempo de 5h. Coluna 1: C43(DE3)pLysS transformada apenas com o plasmídeo pAE não induzido; Coluna 2: Linhagem C43(DE3)pLysS transformada apenas com o plasmídeo pAE induzido; Coluna 3: Controle positivo não induzido; Coluna 4: Controle positivo induzido; Colunas 5: Plasmídeo *cpsec33*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS não induzido com a banda da proteína de aproximadamente 33kDa destacada pelo quadro vermelho; Coluna 6: Plasmídeo *cpsec33*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS induzido com a banda da proteína com cerca de 33kDa destacada pelo quadro vermelho.

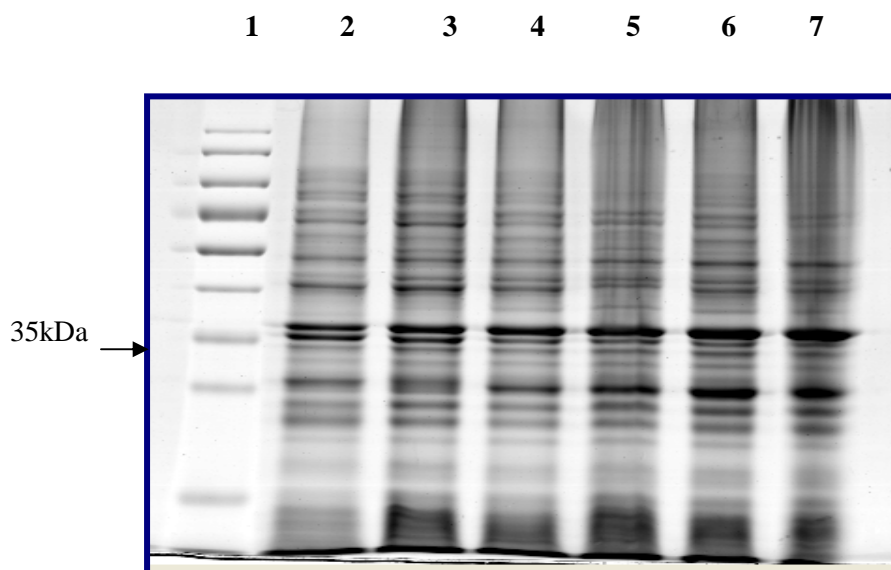


Figura 16. Avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante rCpsec32 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS. Coluna 1: Marcador de peso molecular (Fermentas) com destaque para a banda de 35kDa indicada pela seta; Coluna 2: Plasmídeo *cpsec32/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e não induzido no tempo de 0h; Coluna 3: Plasmídeo *cpsec32/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 1h; Coluna 4: Plasmídeo *cpsec32/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 2h; Coluna 5: Plasmídeo *cpsec32/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 3h; Coluna 6: Plasmídeo *cpsec32/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 4h; Coluna 7: Plasmídeo *cpsec32/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 5h.

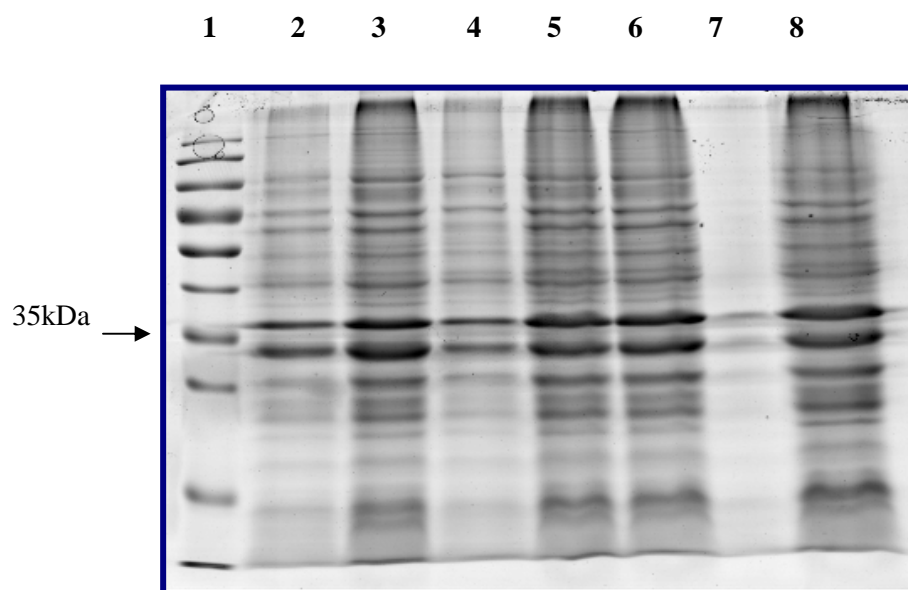


Figura 17. Avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante rCpsec37 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS. Coluna 1: Marcador de peso molecular (Fermentas) com destaque para a banda de 35kDa indicada pela seta; Coluna 2: Plasmídeo *cpsec37/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e não induzido no tempo de 0h; Coluna 3: Plasmídeo *cpsec37/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 1h; Coluna 4: Plasmídeo *cpsec37/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 2h; Coluna 5: Plasmídeo *cpsec37/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 3h; Coluna 6: Plasmídeo *cpsec37/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 4h; Coluna 7: Plasmídeo *cpsec37/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 5h, como ocorreu um problema na aplicação da amostra na canaleta 7, a mesma foi aplicada novamente na canaleta 8.

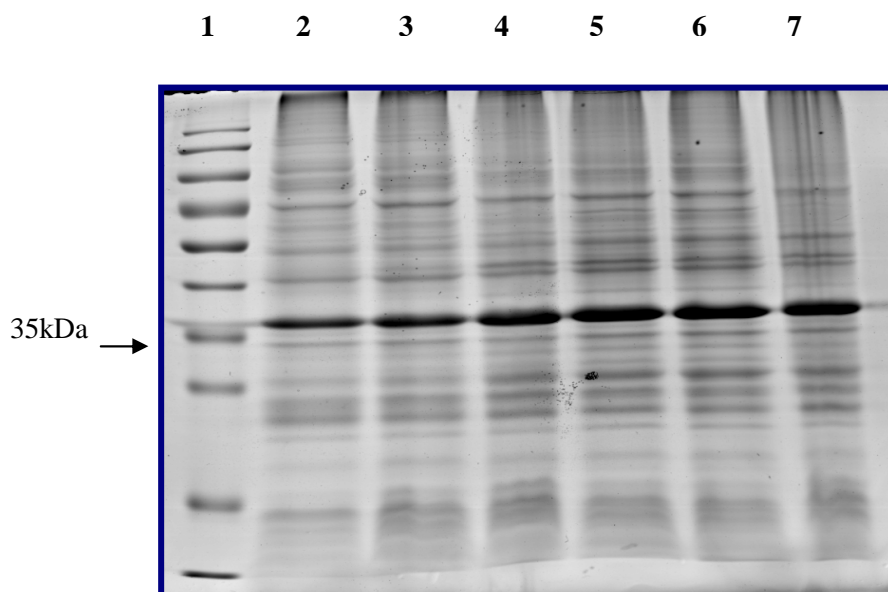


Figura 18. Avaliação da cinética da expressão da proteína recombinante rCpsec33 na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS. Coluna 1: Marcador de peso molecular (Fermentas) com a banda de 35kDa indicada pela seta; Coluna 2: Plasmídeo *cpsec33/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e não induzido no tempo de 0h; Coluna 3: Plasmídeo *cpsec33/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 1h; Coluna 4: Plasmídeo *cpsec33/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 2h; Coluna 5: Plasmídeo *cpsec33/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 3h; Coluna 6: Plasmídeo *cpsec33/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 4h; Coluna 7: Plasmídeo *cpsec33/pAE* transformado na linhagem C43(DE3)pLysS e induzido no tempo de 5h.

5.2.5 Teste de solubilidade

Após os experimentos de avaliação da produção das proteínas recombinantes, as células foram lisadas por sonicação, obtendo o precipitado e o sobrenadante das amostras que continham a linhagem C43(DE3)pLysS e os plasmídeos *cpsec32/pAE*, *cpsec37/pAE* e *cpsec33/pAE*. Apesar das bandas referentes às proteínas recombinantes rCpsec32 com peso molecular esperado de 32 kDa e da rCpsec37 com peso molecular esperado de 37 kDa não serem visualizadas nos experimentos de avaliação de produção das proteínas recombinantes, as mesmas foram avaliadas no teste de solubilidade e novamente não puderam ser visualizadas bandas na altura esperada tanto no precipitado quanto no sobrenadante. Enquanto que uma banda referente à proteína rCpsec33 pôde ser visualizada na amostra correspondente ao precipitado, indicando assim sua insolubilidade (Figura 19).

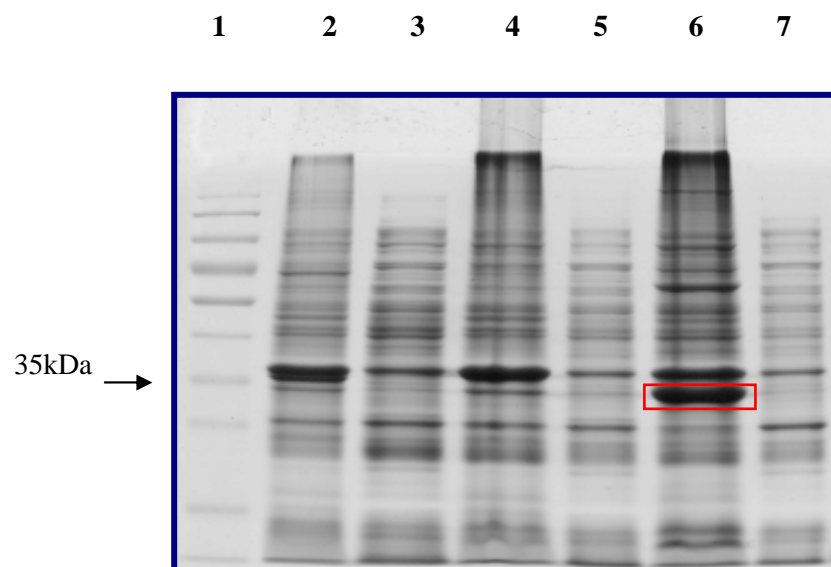


Figura 19. Teste de solubilidade das proteínas recombinantes rCpsec32, rCpsec37 e rCpsec33 após expressão na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS no tempo 5h. Coluna 1: Marcador de peso molecular (Fermentas) com destaque para a banda de 35kDa indicada pela seta; Coluna 2: Plasmídeo *cpsec32*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS (precipitado); Coluna 3: Plasmídeo *cpsec32*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS (sobrenadante); Coluna 4: Plasmídeo *cpsec37*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS (precipitado); Coluna 5: Plasmídeo *cpsec37*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS (sobrenadante); Coluna 6: Plasmídeo *cpsec33*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS (precipitado), a banda de 33kDa é destacada pelo quadro vermelho; Coluna 7: Plasmídeo *cpsec33*/pAE transformado na linhagem C43(DE3)pLysS (sobrenadante).

5.2.6 Western blot

A partir do *Western blot* realizado com anticorpos monoclonais anti-histidina pôde ser verificado a expressão das proteínas recombinantes rCpsec32 e rCpsec33, com o surgimento de uma banda na altura esperada de aproximadamente 32kDa e 33kDa, respectivamente. Quanto à proteína codificada pela *ORF cpsec37*, não houve reação com o anticorpo anti-histidina (Figura 20).

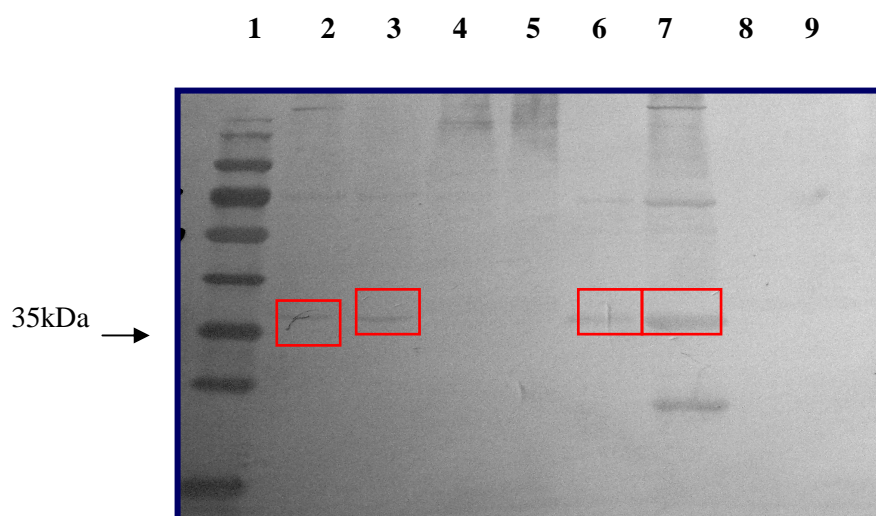


Figura 20. *Western blot* com as proteínas recombinantes rCpsec32, rCpsec37 e rCpsec33 provenientes da expressão na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS no tempo de 4h. Coluna 1: Marcador de peso molecular (Fermentas) com destaque para a banda de 35kDa indicada pela seta; Coluna 2: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec32/pAE* não induzida com a banda da proteína com cerca de 32kDa destacada pelo quadro vermelho; Coluna 3: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec32/pAE* induzida com a banda da proteína com cerca de 32kDa destacada pelo quadro vermelho; Coluna 4: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec37/pAE* não induzida; Coluna 5: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec37/pAE* induzida; Coluna 6: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec33/pAE* não induzida com a banda da proteína com cerca de 33kDa destacada pelo quadro vermelho; Coluna 7: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec33/pAE* induzida com a banda da proteína com cerca de 33kDa destacada pelo quadro vermelho; Coluna 8: Controle negativo (plasmídeo sem inserto) não induzido; Coluna 9: Controle negativo (plasmídeo sem inserto) induzido.

5.3 Avaliação da antigenicidade das proteínas recombinantes

Após o *western blot* ser realizado com o soro positivo para *C. pseudotuberculosis* pôde ser observado o surgimento de bandas referente à proteína recombinante rCpsec33 na altura esperada de aproximadamente 33kDa. Como também foi observado o surgimento de uma banda referente à proteína rCpsec32 com cerca de 32kDa (Figura 21).

Enquanto que para a mesma metodologia, não foi observado reação das proteínas recombinantes com o soro negativo para *C. pseudotuberculosis* (Figura 22).

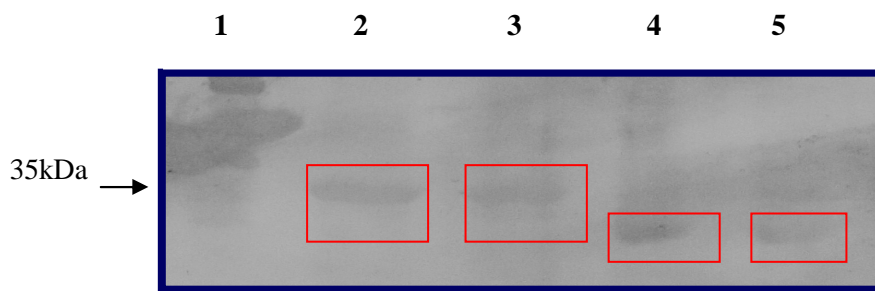


Figura 21. *Western blot* com as proteínas recombinantes rCpsec33 e rCpsec32 após expressão na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS no tempo de 4h, com o soro positivo para *C. pseudotuberculosis*. A seta indica a altura aproximada do marcador de peso molecular (Fermentas) que não foi possível ser visualizado na membrana. Coluna 1: Exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* 1002 utilizado como controle positivo; Coluna 2: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec33/pAE* não induzida com a banda da proteína destacada pelo quadro vermelho. Coluna 3: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec33/pAE* induzida com a banda da proteína destacada pelo quadro vermelho; Coluna 4: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec32/pAE* não induzida com a banda da proteína destacada pelo quadro vermelho; Coluna 5: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec32/pAE* induzida com a banda da proteína destacada pelo quadro vermelho.



Figura 22. *Western blot* com as proteínas recombinantes rCpsec33 e rCpsec32 após expressão na linhagem OverExpress™ C43(DE3)pLysS no tempo de 4h, com o soro negativo para *C. pseudotuberculosis*. Coluna 1: Marcador de peso molecular (Fermentas) com destaque para a banda de 35kDa indicada pela seta; Coluna 2: Exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* 1002 utilizado como controle positivo; Coluna 3: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec33/pAE* não induzida; Coluna 4: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec33/pAE* induzida; Coluna 5: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec32/pAE* não induzida; Coluna 6: Extrato total das proteínas com a construção *cpsec32/pAE* induzida.

6 DISCUSSÃO

O controle da LC pode ser realizado com base em medidas profiláticas através da identificação dos animais infectados, impedindo que os mesmos tenham contato com os animais saudáveis (Guimarães *et al.*, 2011). Medidas mais drásticas são sugeridas, como o descarte de animais que apresentem lesões aparentes ou que sejam soropositivos em testes diagnósticos. Contudo, estes testes podem resultar na geração de falso-positivos e, conseqüentemente, no descarte de animais não infectados (Menzies *et al.*, 2004). A inexistência de um diagnóstico satisfatório para LC, principalmente na fase subclínica da enfermidade compromete o manejo eficaz dos animais e contribui com a disseminação da doença. Diversos testes sorológicos e moleculares foram desenvolvidos para superar este problema, mas a maioria não possui praticidade necessária para a aplicação em campo e custo final reduzido (Dercksen *et al.*, 2000, Williamson, 2001, Menzies *et al.*, 2004, Dorella *et al.*, 2006). Além disso, poucos antígenos foram descritos na literatura como potenciais marcadores da infecção por *C. pseudotuberculosis* (Dorella *et al.* 2009).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou 104 exoproteínas de *C. pseudotuberculosis* (Pacheco *et al.* 2011; Silva, 2011) *in vitro*, através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Estes resultados validaram experimentalmente proteínas preditas anteriormente *in silico* usando o Programa SurfG+, e motivaram a outras análises imunoinformáticas relacionadas ao cálculo da densidade de epítomos dessas exoproteínas (Santos *et al.*, 2012).

Para o presente trabalho, nós selecionamos as 4 *ORFs* com taxas de densidade de epítomos mais significativas de todas as proteínas avaliadas (Santos *et al.*, 2012), dentre elas as que denominamos neste trabalho de *cpsec23*, *cpsec32*, *cpsec37* e *cpsec33* (Tabela 3), pois as mesmas podem indicar uma maior possibilidade de serem utilizadas como bons marcadores para o diagnóstico.

Dentre as seis *ORFs* escolhidas para este trabalho estão a *cpsec23* que codifica uma proteína hipotética; a *cpsec32* que codifica uma proteína pertencente a uma *PAP2 superfamily* com atividade fosfatase (Bernard *et al.*, 2005); a *cpsec37* que é uma *Secretory lipase*, geralmente expressa e secretada durante a infecção gerando uma atividade lipolítica e contribuindo para a persistência e virulência de organismos como *C. albicans*; e a *cpsec33*, que é uma *Trehalose corynemycolyl transferase B*, pertencente a uma família de proteínas que estão presentes especialmente no grupo CMNR e são responsáveis pela síntese de componentes da parede celular (Ramulu *et al.*, 2006). As outras duas *ORFs* escolhidas são

também provenientes de estudos desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa, que identificou através de análises sorológicas proteômicas (SERPA) uma proteína imunoreativa, a NlpC/P60 (*cpsec35*), que pode estar relacionada com a invasão na célula do hospedeiro (Seyffert *et. al.*, 2011). Enquanto que a *cpsec41*, uma proteína hipotética, foi selecionada de uma lista de proteínas preditas por ser exclusiva de *C. pseudotuberculosis* e posteriormente foi confirmada através de análises moleculares (Seyffert, 2009).

Após a seleção dessas 6 *ORFs*, as mesmas foram submetidas à análises bioinformáticas, onde foram observadas a presença de peptídeo sinal e a ausência de motivos transmembrânicos em todos os produtos gênicos (Tabela 3). Dois dos seis produtos gênicos, referentes às proteínas hipotéticas, não apresentaram domínios conservados e apenas uma proteína hipotética não apresentou similaridade no *blastx* com outras espécies bacterianas do gênero *Corynebacterium* (Tabela 3). De acordo com essa análise *in silico*, a *cpsec41* apresentou-se como exclusiva de *C. pseudotuberculosis*. Nas actinobactérias, não há relatos na literatura da ocorrência de alvos exclusivos de microrganismos das espécies que constituem esse grupo. Em outras bactérias, há descrições do gene *omp-31* de *Brucella* (Vizcaino *et. al.*, 1997) e o gene *lipl32* de *Leptospira* (Haake *et. al.*, 2000), que representam todas as espécies bacterianas dos respectivos gêneros, e são muito utilizados na identificação de isolados e em métodos diagnósticos, ressaltando a importância da *cpsec41* para a elaboração de testes para a LC, conforme relatado anteriormente por Seyffert (2009).

Os quatro produtos gênicos restantes apresentaram domínios conservados (Tabela 4). O produto gênico da *cpsec32* apresenta dois domínios conservados, o primeiro de uma fosfatase ácida bacteriana, cujo papel na fisiologia bacteriana ainda continua indeterminado e outro de um fosfolípídeo fosfatase associado à membrana que está relacionado ao metabolismo de lipídeos. Quanto ao produto gênico da *cpsec37* foi encontrado um domínio conservado de uma lipase secretada, cuja função está relacionada com atividade lipolítica como mencionado anteriormente. Na análise do produto gênico da *cpsec33*, foi encontrado um domínio conservado com um grupo de esterases e lipases, incluindo lipases de fungos, as quais atuam sobre os ésteres carboxílicos (Chahinian & Sarda, 2009). Para o produto gênico da *cpsec35* foram identificados dois domínios conservados, o primeiro pertencente à família NlpC/P60 que apresenta função desconhecida e o segundo, com hidrolases associadas à parede celular, das quais fazem parte proteínas associadas à invasão bacteriana no hospedeiro.

Posteriormente a caracterização das 6 *ORFs*, as mesmas foram submetidas a clonagem molecular e expressão das proteínas recombinantes. A primeira etapa realizada foi à amplificação dos alvos gênicos com a utilização de iniciadores específicos e a *Platinum*[®] Taq

DNA Polymerase (Invitrogen). Os insertos obtidos apresentaram bandas na altura esperada para *cpsec23*, *cpsec35* e *cpsec41*, com 594pb, 939pb e 1092pb, respectivamente. Assim como, para *cpsec32* com aproximadamente 882bp, para *cpsec37* com 1019bp e para *cpsec33* com 915bp.

O processo de clonagem foi realizado em colaboração com a Profa. Sibeles Borsuk do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, para isso o plasmídeo inicialmente escolhido foi o pAE por ser muito utilizado e ter obtido resultados satisfatórios na expressão de proteínas heterólogas. Três clones referentes às *cpsec32*, *cpsec37* e *cpsec33* foram obtidos. Como uma forma alternativa, o vetor pET28a foi utilizado para a clonagem da *cpsec23*, *cpsec35* e *cpsec41*, mas ainda não obtivemos sucesso nessa etapa. Uma explicação para isso seria a baixa concentração de DNA obtida durante a purificação e consequentemente, a presença de falsos transformantes. Outras metodologias de extração de DNA plasmidiano estão sendo realizadas para solucionar este problema. Uma vantagem do vetor pET28a é a possibilidade de excisão da cauda de histidina após purificação da proteína recombinante, uma vez que a retirada da mesma após a purificação é necessária pela possibilidade dos resíduos de histidina alterarem a conformação da proteína, afetarem sua função e dificultarem sua cristalização (Araújo *et al.*, 2000, Goel *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001, Bucher *et al.*, 2002, Fonda *et al.*, 2002, Smyth *et al.*, 2003, Chant *et al.*, 2005, Arnau *et al.*, 2006). A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada em quatro diferentes linhagens de *E. coli* [OverExpress™ C41(DE3) pLysS, OverExpress™ C41 (DE3), OverExpress™ C43(DE3) e OverExpress™ C43(DE3)pLysS], que foram selecionadas por terem contribuído de forma significativa na expressão solúvel de proteínas recombinantes. As linhagens C41 (DE3) e C43 (DE3) são linhagens que favorecem a super-expressão de algumas proteínas de membrana e globulares, incapazes de serem expressas em altos níveis na linhagem BL21 (DE3). Além disso, os corpos de inclusão estão ausentes e outros estudos relatam que a estabilidade dos plasmídeos codificando proteínas tóxicas é aumentada em C41 (DE3) e, especialmente, em C43 (DE3) (Sørensen & Mortensen, 2005).

Durante a avaliação da expressão das proteínas recombinantes, foi observada uma maior produção da proteína rCpsec33 na OverExpress™ C43(DE3) pLysS (Figura 16), com uma banda de aproximadamente 33kDa. A expressão das proteínas recombinantes rCpsec37 e rCpsec32 não foi observada (Figura 15), talvez pela baixa produção das mesmas. Esse fato pode estar relacionado à presença de alguns códons nesses genes de *C. pseudotuberculosis* que são raros em *E. coli* (*codon usage bias*) que pode ser fator limitante por dificultar a expressão heteróloga das proteínas nas linhagens de expressão (Sahdev *et al.*, 2008).

A presença da banda diferenciada na fração induzida da coluna 6 (Figura 20) tem o tamanho esperado para a proteína *Trehalose corynomycolyl transferase B* (rCpsec33), aproximadamente 33kDa, revelando sucesso na metodologia adotada. Além disso, após lise celular, foi constatado que a proteína se apresentou totalmente na fração insolúvel.

A produção em maior escala das proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis* em *E. coli* C43(DE3)pLysS será realizada para que as quantidades obtidas sejam suficientes tanto para o processo de purificação quanto para as etapas de caracterização subsequentes.

No que diz respeito, ao *western blot* realizado com as proteínas recombinantes rCpsec33, rCpsec37 e rCpsec32, podemos observar, que tanto para a proteína da construção *cpsec32/pAE* quanto para a proteína da construção *cpsec33/pAE*, há uma produção basal da proteína na fração não induzida, podendo indicar que o promotor, no caso o T7, esteja aberto.

Após o término dos testes de antigenicidade, as proteínas recombinantes rCpsec32 e rCpsec33 serão utilizadas na otimização do TIH, que contribuirá para o controle da LC nos rebanhos de pequenos ruminantes.

7 CONCLUSÕES

A caracterização das seis *ORFs* *cpsec23*, *cpsec32*, *cpsec33*, *cpsec35*, *cpsec37* e *cpsec41* foram realizadas por análises bioinformáticas;

Três clones foram obtidos utilizando o vetor pAE com as *ORFs* *cpsec32*, *cpsec33* e *cpsec37*. Porém, ainda não foi possível clonar as *ORFs* *cpsec23*, *cpsec35* e *cpsec41* no vetor pET28a;

Não houve expressão em *E. coli* da proteína recombinante referente à *ORF* *cpsec37*;

As proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis* referentes às *ORFs* *cpsec32* e *cpsec33* foram expressas em *E. coli* e demonstraram antigenicidade nos ensaios preliminares.

8 PERSPECTIVAS

- Confirmar a integridade dos insertos nos vetores por sequenciamento;
- Purificar as proteínas recombinantes;
- Avaliar a antigenicidade das proteínas recombinantes purificadas, utilizando amostras de caprinos infectados e não infectados através de ELISA, *Western blot* e Interferon-gama;
- Padronizar o TIH com as proteínas recombinantes para utilização em trabalhos epidemiológicos e de controle da *doença*;
- Patentear e transferir o TIH para a indústria.

REFERÊNCIAS

- AIRELLO, S.; MAYS, A.; OLIVEIRA, P.M.A. Manual Merck de Veterinária. Editora ROCA, São Paulo, 8.ed. 2001.
- ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; PIRES, P.C. Linfadenite caseosa: patogenia-diagnóstico-controle, Artigo Técnico. Documento n° 27, Embrapa Sobral CE, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 1997.
- ALVES, F.S.F. & OLANDER, H. J. Teste de pele em caprinos vacinados e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Pesq. Agropec. Bras., v. 34, p. 21-27, 1999.
- ANTUNES, C. A. Desenvolvimento de um Teste Intradérmico de Hipersensibilidade com antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico subclínico da Linfadenite Caseosa em pequenos ruminantes. 81p. Dissertação. 2011.
- ARAÚJO, A. *et. al.* Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 272, p. 480-484, 2000.
- ARNAU, J. *et. al.* Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 48, p. 1-13, 2006.
- 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.
- AWAD, F.J. Serological investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. I. Agglutination test. *Am. J. Vet. Res.*, v.81, p. 251-253, 1960.
- BAIRD G.J. & FONTAINE M.C., *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J. Comp. Path.* v. 137, n. 4, p. 179-210, set, 2007.
- BARINOV A, LOUX V, HAMMANI A, NICOLAS P, LANGELLA P, EHRLICH D, MAGUIN E AND GUCHTE M . Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *Proteomics*, 9, 61–73, 2009.
- BERNAD, R. *et al.* BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undercaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *Jounal Biological Chemistry*, v. 280, 2005
- BIBERSTEIN, E.L. & HIRSH, D.C. 2003. Corynebactérias; *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*; *Rhodococcus equi*. In: Hirsh D.C. & Zee Y.C. (Ed.), *Microbiologia Veterinária*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2.ed. p.119-126, 1971.
- BILLINGTON, S.J.; ESMAY, P.A.; SONGER, J.G.; JOST, B.H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 208, p. 41–45, 2002.

- BINNS, S. H., GREEN L. E., BAILEY M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.* 123, 169–179, 2007.
- BOGDAN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C.F.; ELLIS, J.A.; Nitric oxide production following *in vitro* stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 56, p. 299-310, 1997.
- BRAITHWAITE, C.E., SMITH E.E., SONGER J.G., REINE A.H., Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*., *Vet. Microbiol.* 38. 59-70, 1993.
- 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.
- BUCHER, M. H. *et. al.* Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, p. 392-397, 2002.
- BURREL, D.H. Non-specific agglutination of *C. ovis* by precolostral and young lamb sera. *Res. Vet. Sci.* v.25, p. 373-375, 1978.
- BURREL, D.H. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Res. Vet. Sci.* v. 28, p. 190-194, 1980a.
- BURREL, D.H. A simplified double immunodiffusion technique for detection of *C. ovis* antitoxin. *Res. Vet. Sci.* v.28, p. 234-237, 1980b.
- BUXTON, A. & FRASER, G. *Corynebacterium*, in: Buxton A., Fraser G. (Eds.), *Animal Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh. p. 177–183, 1977.
- CAMERON, H.S. & McOMIE, W.A. The agglutination reaction in *Corynebacterium ovis* infection. *Cornell Vet.* v.30, p. 41-46, 1940.
- CARMINATTI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA, L.F.; PAULE, B.J.A.; VALE, V.L.; REGIS, L.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R. AND MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *R. Ci. Méd. Biol.* 2, 88-93, 2003.
- CARNE, H.R. The diagnosis of caseous lymphadenitis by means of intradermal inoculation of allergic reagents, *Aust. Vet. J.* v.8, p. 42-47, 1932.
- CARNE, H.R. & ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels, *Nature*, v. 271, p. 246-248, 1978.
- CARNE, H.R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. *J. Path. Bact.* v.51. 199-212. 1940.
- CASSAMAGNAGHI, A. Le diagnostic de la lympho-adenite caseuse des moutons par L'intradermo-reação a la Preisz-Nocardine. *Bull. Acad. Vet. France*, v.4, p. 330-333. 1931.

CESARI, E. Sur le diagnostic de la lymphadénie caséense par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. Bull. Acad. Vét. France n.3 vol. 6 p. 291-295, 1931.

CASTRO, T.L.P., Avaliação da Expressão Diferencial de Genes Codificadores de Fatores Sigma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em Resposta a Agentes Geradores de Estresse Nitrosativo. Tese. Belo Horizonte. 128p. 2009.

CETINKAYA, 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. V. 2359. p. 1–9, 2002.

CESARI, E. Sur Le diagnostic de la lymphadénie caséense par l'intradermo-réaction à la Preisz-Nocardine. BULL. Acad. Vét. France. n.3, v.6, p. 291-295, 1930.

CHANT, A. *et. al.* Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreaA causes a conformational change at the DNA-binding site. Protein Expr Purif 39, p. 152-159, 2005.

CHAHINIAN, H. & SARDA L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. Protein & Peptide Letters, v. 16, p. 1149-1161, 2009.

COSTA FILHO, G.A. Diagnóstico precoce da linfadenite caseosa dos caprinos através da intradermo-reação. An. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 161-170, 1978.

COYLE, M.B. & LIPSKY, B.A. *Coryneform* bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects, Clin. Microbiol. Rev., v. 3, p. 227–246, 1982.

COSTA, M. P ; MCCULLOCH, J.A; ALMEIDA; S. S.; DORELLA, F. A.; FONSECA, C. T; OLIVEIRA, D. M.; TEIXEIRA, M. F.S.; LASKOWSKA E.; LIPINSKA; B.; MEYER R.; PORTELA, R. W; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Molecular characterization of the *Corynebacterium pseudotuberculosis hsp60-hsp10* operon, and evaluation of the immune response and protective efficacy induced by *hsp60* DNA vaccination in mice. *BMC Research Notes* 4:243 2011.

CYRILLO, F.C. Padronização do alérgoteste da tuberculina em ovinos (*Ovis Áries*).2006.92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

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

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, 2006.

DORELLA, F.A. Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Tese) Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Biologia Geral. 191 p. 2009.

- DORELLA, F. A. *et. al.* Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development. *Expert Reviews Vaccines*, v. 8, p. 205-213, 2009.
- EGEN, N.B.; CUEVAS, W.; McNAMARA, P.J.; SAMMONS, D.W.; HUMPHREYS, R.; SONGER, J.G. Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing, *Am. J. Vet. Res.*, v. 50, p. 1319–1322, 1989.
- EGGLETON, D.G.; MIDDLETON, H.D.; DOIDGE, C.V.; MINTY, D.W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells, *Aust. Vet. J.*, v. 68, p. 317-319, 1991.
- 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.
- FARID, A. & MAHMUD, A.H. Primary trials on the diagnosis of caseous lymphadenitis in Egypt by means of intradermal inoculation of allergic material. *Vet. Med. J.*, v. 7, p.253-258, 1960.
- FONDA, I. *et. al.* Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties. *Scientific World Journal* 2, p. 1312-1325, 2002.
- GOEL, A. *et. al.* Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv-construct. *Biochem Biophys Acta* 1523, p. 13-20, 2000.
- GUIMARÃES, A. S.; SEYFFERT, N.; BASTOS, B.; PORTELA, R. W. ; MEYER, R.; CARMO, F. B.; L.S., V.; CRUZ, J. C. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Ruminant Research*, v. 87, p. 86-91, 2009.
- GUIMARAES, A. S.; Carmo, F.B.; PAULETTI, R. B.; SEYFFERT, N ; RIBEIRO D.; Lage, A.P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *The IIOAB journal*, v. 2, p. 33-43, 2011.
- HAAKE, D.A; CHAO, G.; ZUERNER, R.L.; BARNETT, J.K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P.N.; BOLIN, C.A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.*, v. 68, p.2276-85. 2000.
- HANSMEIER, N.; CHAO, T.C.; KALINOWSKI, J.; PÜHLER, A.; TAUCH, A. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Prot.*, v. 6, p. 2465-76, 2006.

- 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.
- HAUTEFORT, I.; THOMPSON, A.; ERIKSSON-YGBERG, S.; PARKER, M.L.; UCCHINI, S.; DANINO, V.; BONGAERTS, R.J.; AHMAD, N.; RHEN, M.; HINTON, J.C. During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. Cell Microbiol., v. 10, p. 958-84, 2008.
- HODGSON, A.L.M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; ROTHEN, 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.
- HOLSTAD, G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. IX. The effect of vaccination against natural infection, Acta Vet. Scand., v. 30, p. 285-293, 1989.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds.), Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 593, 1994.
- JANKOVIC, D.; COLLETT, M. A.; LUBBERS, M.W.; Rakonjac, J. Direct selection and phage display of a Gram-positive secretome. Genome Biol., v. 8, R266, 2007.
- JOHNSON, E.H.; OLIVEIRA, S.C.; RIBEIRO, O.C.; SILVA, J.A. Serological detection of abscesses caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* using the DIG-ELISA. Proc. IV Int. Conf. Goats, Brasília, p. 1358, 1987.
- JOLLY, R.D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*, J. Appl. Bacteriol., v. 29, p. 189–196, 1966.
- JONES, D. & COLLINS, M. D. Irregular, nonsporing gram-positive rods, 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. Patologia Veterinária. Ed. Manole, 6ª ed. 2000.
- KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. Annu Rev Immunol, v. 11, p. 129-63, 1993.
- KESTINTEPE H. Stabilization of *Corynebacterium ovis* antigens for serum agglutination test. Firat Univ. Vet. Fak., Dergisi. v. 3, 84-93, 1976.
- KIM, K. M. *et. al.* Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 57, p. 759-762, 2001.

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

LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; COSTA, SG. Alérgeno para o diagnóstico da linfadenite caseosa em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.7, n.2, p.27-32, 1987.

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.

LINHARES, H. Contribuição ao estudo da patologia da lepra murina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.37 n.4, 1944.

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

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

LUND, A.; ALMLID, T.; LARSEN, H.J. & STEINE, T. Antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in adult goats from a naturally infected herd. *Acta Vet. Scand.*, v.23, 473-482, 1982.

MAKI, L.R.; SHEN, S.; BERGSTROM, R.C. & STETZENBACH, L.D. Diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* v.46, p. 212-214, 1985.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa DAS n. 6 de 8 de janeiro de 2004. Regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, 2004.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa DAS n. 87 da secretaria de Defesa Agropeduéria, de 10 de dezembro de 2004. Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) 2004.

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

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

MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. The Genus *Corynebacterium*, in: Merchant I.A., Packer R.A. (Eds.), *Veterinary bacteriology and virology*, The Iowa State University Press, Iowa, pp. 425-440, 1967.

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R.; MOURA-COSTA L.; SCHAER, R.; NASCIMENTO, I.; FREIRE, S. In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 107, 249-54, 2005.

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

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

OLIVEIRA, G. C. Atividades da Rede Genoma de Minas Gerais no biênio 2006-2007-apoio à Agroindústria: Sequenciamento do genoma da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Disponível em: <<http://bioinfo.cpqrr.fiocruz.br/files>> acesso em: 12 ago. 2012.

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

PACHECO, L.G.C. Avaliação do papel dos fatores sigma ECF da *Corynebacterium pseudotuberculosis* na virulência e na regulação da expressão gênica. Tese. 2009.

PACHECO, L. G. C., SLADE, S. E., SEYFFERT, N., SANTOS, A. R., CASTRO, T. L. P., SILVA, W. M., SANTOS, A. V., SANTOS, S. G., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A. R., PIMENTA, A. M. C., MEYER, R., SILVA, A., SCRIVENS, J. H., OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, A., DOWSON, C. G. AND AZEVEDO, V. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *BMC Microbiol.*, v. 11, p.12, 2011.

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. Estudos de antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e de suas interações com o hospedeiro caprino. Tese, Doutorado em Imunologia, Instituto de Ciências da saúde da UFBA. 138p. 2003.

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

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

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.

RAMULU, H. G.; ADINDLA S.; GURUPRASAD L. Analysis and modeling of mycolyl transferases in the CMN group. Bioinformation, v. 1(5), 2006.

REBOUÇAS, M.F; PORTELA, R. W.; LIMA, D. D.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; VALE, V. V.; MYIOSHI, A. AZEVEDO, V. MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific interferon-gamma production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. J Vet Diagn Invest, v. 23, 2011.

RENSHAW, H.W.; GRAFF, V.P. & GATES, N.L. Visceral caseous lymphadenitis in thin ewe syndrome: Isolation of *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *Moraxella* spp from internal abscesses in emaciated ewes. Am. J. Vet. Res. v.40, 1110-1114, 1979.

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.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol. Cell Biochem., 2008.

SAMBROOCK, J.; RUSSELL, D. Molecular cloning: a laboratory manual, 3ed. Cold Spring Harbor Press. 2000.

SANTOS, A. R. A genômica como ferramenta para seleção de alvos contra a linfadenite caseosa. 412p. Tese 2012.

SANTOS, A. R.; BASTOS, V.; BARBOSA, E.; BAUMBACH, J.; PAULING, J.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Mature Epitope Density: A strategy for detecting exported prokaryotic protein related to antigenicity and pathogenicity. Oxford University Press, 2012.

SEYFFERT, N. Isolamento, identificação e análise molecular do gene *cpsec39* codificador de uma proteína exclusiva de *Corynebacterium pseudotuberculosis*: perspectivas no desenvolvimento de métodos profiláticos para o controle da linfadenite caseosa. 97p. Tese. 2009.

- SEYFFERT, N. *et al.* High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Res. Vet. Sci. v. 88. p. 50-55, 2010.
- SEYFFERT, N. *et al.* Preliminary serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Journal of integrated OMICS, v. 2, p. 1-5, 2011.
- SHEN, D.T.; JEN, L.W. & GORHAM, J.R. The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Proc. 3rd Int. Conf. Goat Prod. Dis., Tucson, Arizona, p. 445-448, 1982.
- SHIGIDI, M.T.A. An indirect haemagglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Res. Vet. Sci. v.24, p. 57-60, 1978.
- SHIGIDI, M.T.A. Antigenic relationship of various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Bull. Epizootic Dis. Africa. v.22, p. 263-269, 1974.
- SHIGIDI, M.T.A. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. Brit. Vet. J. v. 135, p 172-177, 1979.
- SILVA, P. E. G.. PINHEIRO, S. R.; LEAL, M. L. R.; BERTAGNON, H. G.; MOTTA, P. M. P. C.; SINHORINI, I.L.; VASCONCELLOS, S. A.; BENESI, F. J. Teste da tuberculinização em caprinos (*Cabra hircus*) experimentalmente sensibilizados. Ciência Rural, v.36, n.3, p. 880-886, 2006.
- SILVA, W. M. Caracterização do exoproteoma de duas linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através das técnicas de 2D-DIGE e espectrometria de massa. 115p. Dissertação. 2011.
- SMYTH, D. R. *et al.* Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. Protein Sci 12, p. 1313-1322, 2003.
- SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence, Trends Microbiol., v. 5, p. 156–160, 1997.
- SØRENSEN, H. P. & MORTENSEN K. K. Soluble expresión of recombinat proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, p.1-8, 2005.
- 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.
- TAUCH, A., KAISER, O., HAIN, T., GOESMANN, A., WEISSHAAR, B., ALBERSMEIER, A., BEKEL, T., BISCHOFF, N., BRUNE, I., CHAKRABORTY, T., KALINOWSKI, J., MEYER, F., RUPP, O., SCHNEIKER, S., VIEHOEVER, P. AND PÜHLER, A. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* k411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora *J. Bacteriol.*, 187: 4671-4682, 2005.

VIZCAINO, N.; VERGER, J.; GRAYON, M.; ZYGMUNT, M.S.; CLOECKAERT, A. DNA polymorphism at the omp-37 locus of *Brucella spp.*: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology* (1997),143, 2913-2921.

WILLIAMSON, L.H. Caseous Lymphadenitis en Small Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. n. 2,v.17, p.359-371, 2001.

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

YEN, Y.T.; BHATTACHARYA, M.; STATHOPOULOS, C. Genome-wide in silico mapping of the secretome in pathogenic *Yersinia pestis* KIM. *FEMS Microbiol Lett.* v.279, p.56-63, 2008.