

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterização do exoproteoma de duas linhagens de
Corynebacterium pseudotuberculosis através das
técnicas de 2D-DIGE e espectrometria de massa**

Wanderson Marques da Silva

**Belo Horizonte – Minas Gerais
Fevereiro de 2011**

Wanderson Marques da Silva

**Identificação e caracterização do exoproteoma de
duas linhagens de *Corynebacterium*
pseudotuberculosis através das técnicas de 2D-DIGE
e espectrometria de massa**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Inovações Biofarmacêuticas,

Orientador: Prof. Vasco Azevedo
Co-orientador: Prof. Anderson Miyoshi

Belo Horizonte – Minas Gerais
Fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força durante todo o trabalho.

Ao Prof. Vasco Azevedo pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, confiança no meu potencial para a realização deste trabalho e orientação.

Ao Prof. Anderson Miyoshi pelos esclarecimentos científicos e orientação.

Ao Prof. Artur Silva pela oportunidade realizar grande parte deste trabalho em seu laboratório e por acreditar na realização do mesmo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A Alessandra Ciprandi por todo apoio e ajuda que foi concedida durante todo o trabalho.

A minha “chefa-mãe” Núbia Seyffert por acreditar no meu trabalho, por toda ajuda e ensinamento.

Ao Luis Pacheco pelos esclarecimentos científicos e amizade.

Ao Agenor Valadares que foi fundamental para a conclusão deste trabalho e amizade.

A Fernanda Dorella pela ajuda na correção deste trabalho e amizade.

Aos meus amigos ausentes e presentes do LGCM, que juntos formamos uma grande equipe. Obrigado a todos!!!

Aos amigos do Laboratório de Polimorfismo de DNA ICB/UFPA, pela amizade que foi construída.

Principalmente aos meus Pais e meus irmãos por estarem sempre ao meu lado nos momentos de tristeza e alegria.

RESUMO

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa, doença infecto-contagiosa crônica que acomete pequenos ruminantes. Os principais fatores de virulência desta bactéria são a exotoxina fosfolipase D e lipídios tóxicos da parede celular. Estudos demonstraram que proteínas extracelulares são importantes para: aquisição de nutrientes, interação com hospedeiro, sobrevivência da bactéria em diversos ambientes e por tanto representam alvos para a produção de vacinas e métodos de diagnóstico. Os genomas das linhagens 1002 e C231 de *C. pseudotuberculosis* isoladas de caprino do Brasil e de ovino da Austrália respectivamente foram seqüenciados e predições *in silico* geraram uma lista destas proteínas com suas prováveis funções. Neste trabalho, através de abordagens proteômicas, foi realizada uma análise comparativa entre proteínas extracelulares das duas linhagens para gerar mapas proteicos, avaliar a diferença de expressão e validar os resultados preditos *in silico*. As amostras protéicas foram obtidas através da técnica de fracionamento em três fases. Para estudar a diferença de expressão foi utilizada a técnica de 2D-DIGE que após a análise por espectrometria de massa resultou na caracterização de 10 proteínas, 5 na linhagem 1002 e 5 na linhagem C231, relacionadas a fatores de virulência, resposta a estresse, componentes estruturais e funções desconhecidas. Através da associação 2-DE/MALDI-TOF MS/MS foi possível gerar mapas proteicos e caracterizar 55 e 45 proteínas extracelulares das linhagens 1002 e C231 respectivamente. A união dos dados obtidos neste trabalho com os resultados obtidos Pacheco et al. (2011), possibilitou caracterizar experimentalmente 104 proteínas do exoproteoma de *C. pseudotuberculosis*. Este estudo demonstrou que, mesmo sendo bactérias da mesma espécie, há diferenças de expressão e a presença de proteínas específicas para cada linhagem, estando estas relacionadas a fatores de virulência e fisiologia celular que podem influenciar no mecanismo de infecção e adaptação ao hospedeiro, favorecendo a progressão e instalação da doença. Além disso, este trabalho abre perspectivas para estudos específicos com as proteínas identificadas, para possível aplicação no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e vacinas.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is the etiological agent of caseous lymphadenitis - a chronic infectious disease that affects small ruminants. The main virulence factors of this bacterium are exotoxin phospholipase D and toxic lipid on cell wall. Studies have shown that extracellular proteins are important for: nutrient acquisition, interaction with the host, survival of bacteria in different environments and targets for vaccine production and methods for diagnosis. The genomes of strains 1002 and C231 of *C. pseudotuberculosis* isolated from Brazil goat and sheep and from Australia, respectively, were sequenced and a list of the aforementioned proteins with their likely functions was generated by in silico predictions. In the advent of this work, a comparative analysis was performed between two strains of extracellular proteins for characterization, assessment of difference in expression and validation of the results predicted in silico using proteomic approaches. The protein samples were obtained by fractionation technique in three phases. To study the difference in expression, 2D-DIGE technique was used. After analysis by mass spectrometry resulted in the characterization of 10 proteins – (5 from 1002 and 5 from strain C231 strain), related to virulence factors, stress response, structural components and unknown functions. Through the association of 2-DE/MALDI-TOF MS/MS it became possible to generate maps and characterize 55 and 45 extracellular proteins of strains 1002 and C231 respectively. The union of the present data with those obtained Pacheco et al. (2011), allowed experimentally characterized 104 proteins from the exoproteoma of the *C. pseudotuberculosis*. This work portrays the fact that even though the bacteria of the same species, there exist differences in expression and presence of specific proteins in each strain, as they are related to virulence factors and cellular physiology that may influence the mechanism of infection and adaptation to the host, which contribute to the progression and onset of illness. Furthermore, this work opens perspectives for specific studies of the proteins identified for possible application in the development of diagnostic methods and vaccines.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
1 APRESENTAÇÃO	10
1.1 Colaborações.....	10
1.2 Estrutura do manuscrito.....	10
1.3 Introdução Geral.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Linfadenite caseosa.....	14
2.1.2 Impactos sócios econômicos.....	14
2.1.2 Epidemiologia.....	15
2.1.3 Transmissão.....	16
2.1.4 Patogenia.....	17
2.1.5 Tratamento.....	18
2.1.6 Medidas profiláticas.....	18
2.1.7 Diagnóstico.....	19
2.2 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	21
2.2.1 Aspectos microbiológicos.....	21
2.2.2 Determinantes da virulência de <i>C. pseudotuberculosis</i>	22
2.2.3 Suscetibilidade antimicrobiana.....	24
2.2.4 Características do genoma da <i>C. pseudotuberculosis</i>	24
2.2.5 Proteínas extracelulares de <i>C. pseudotuberculosis</i>	25
2.3 Proteômica.....	27
2.4 Técnicas proteômicas.....	28
2.4.1 Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.....	28
2.4.2 Eletroforese bidimensional de fluorescência diferencial (2D-DIGE).....	29
2.5 Proteômica de microrganismos procaríotos.....	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo.....	38
4.2 Extração das proteínas extracelulares.....	39
4.3 (SDS-PAGE).....	39
4.4 Eletroforese bidimensional (2-DE).....	39
4.5 Coloração por Coomassie coloidal.....	40
4.6 Eletroforese de Fluorescência Diferencial em Gel Bidimensional (2D-DIGE).....	40
4.7 Digitalização e análise das imagens.....	41
4.8 Digestão triptica em gel de poliacrilamida.....	42
4.9 Espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) e busca em banco de dados.....	42
4.10 Predição da localização sub-celular das proteínas identificadas.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 PARTE I: Obtenção das amostras e padronização dos géis bidimensionais.....	44
5.1.1 Padronização do cultivo e crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i>	44
5.1.2 Avaliação da qualidade das proteínas extracelulares de <i>C. pseudotuberculosis</i>	45
5.1.3 Padronização dos géis bidimensionais.....	46

5.1.4	Conclusões da parte I.....	49
5.2	PARTE II: Análise da expressão diferencial das proteínas extracelulares de <i>C. pseudotuberculosis</i> por eletroforese bidimensional de fluorescência diferencial (2D-DIGE)	50
5.2.1	Eletroforese bidimensional de fluorescência diferencial.....	50
5.2.2	Avaliação da qualidade das replicas biológicas	52
5.2.3	Detecção e análise da expressão diferencial das proteínas marcadas.....	53
5.2.4	Identificação das proteínas	54
5.2.5	Conclusões da parte II	62
5.3	PARTE III: Caracterização do exoproteoma de <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizando eletroforese bidimensional (2-DE).	63
5.3.1	Eletroforese bidimensional	63
5.3.2	Identificação dos <i>spots</i> protéicos por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) e busca em banco de dados	63
5.3.3	Proteínas identificadas relacionadas à virulência e resposta imunológica	77
5.3.4	Proteínas identificadas relacionadas a processos oxidativos.....	79
5.3.5	Predição da localização sub-celular das proteínas identificadas	81
5.3.6	Análise de proteínas extracelulares de <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizando diferentes abordagens	82
6	CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....	86
6.1	Conclusões gerais	86
6.2	Perspectivas	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
7	ANEXOS.....	101
7.1	Anexo 1	101
7.2	Anexo 2.....	109
7.2	Anexo 3.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas características da LC	14
Figura 2: Representação esquemática dos passos da 2D-DIGE	30
Figura 3: Representação esquemática da ligação entre <i>CyDye</i> com resíduo de lisina	31
Figura 4: Curva do crescimento de <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem C231 e 1002 em MQD	45
Figura 5: SDS-PAGE proteínas extracelulares.....	47
Figura 6: 2-DE da matriz extracelular de <i>C. pseudotuberculosis</i>	48
Figura 7: Perfil eletroforético das proteínas extracelulares das linhagens 1002 e C231.....	48
Figura 8: 2D-DIGE das proteínas extracelulares, padrão interno.....	50
Figura 9: 2D-DIGE das proteínas extracelulares da linhagem C231	51
Figura 10: 2D-DIGE das proteínas extracelulares da linhagem 1002	51
Figura 11: 2D-DIGE sobreposição das imagens	52
Figura 12: Gráficos de dispersão das replicas biológicas	53
Figura 13: 2-DE dos <i>spots</i> protéicos com diferença de expressão significativa, corado com <i>Coomassie</i>	55
Figura 14: Distribuição das 60 proteínas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	64
Figura 15: 2-DE das proteínas extracelulares da linhagem C231 corado com <i>Coomassie</i>	65
Figura 16: 2-DE das proteínas extracelulares da linhagem 1002 corado com <i>Coomassie</i>	67
Figura 17: Classificação das proteínas extracelulares comuns das linhagens 1002 e C231 em níveis de processos biológicos	76
Figura 18: Proporção entre as proteínas extracelulares da linhagem 1002, identificadas experimentalmente e preditas por <i>softwares</i> de bioinformática	84
Figura 19: Proporção entre as proteínas extracelulares da linhagem C231, identificadas experimentalmente e preditas por <i>softwares</i> de bioinformática	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características bioquímicas da <i>C. pseudotuberculosis</i>	22
Tabela 2: Lista das proteínas identificadas na imunoproteômica	26
Tabela 3: Estudos utilizando a técnica de 2D-DIGE em procariotos	34
Tabela 4: Meio quimicamente definido para cultivo de <i>C. pseudotuberculosis</i>	38
Tabela 5: Desenho experimental	41
Tabela 6: Lista de proteínas extracelulares diferencialmente expressas identificadas por espectrometria de massa.....	56
Tabela 7: Lista de proteínas extracelulares comuns entre as linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i>	68
Tabela 8: Lista de proteínas extracelulares exclusivas da <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem 1002	73
Tabela 9: Lista de proteínas extracelulares exclusivas da <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem C231	75
Tabela 10: Listagem das 11 proteínas não identificadas no TPP/LCMS ^E	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Instituições

ICB - Instituto de Ciências Biológicas
LGCM - Laboratório de Genética Celular e Molecular
LPDN - Laboratório de Polimorfismo de DNA
RGMG - Rede Genoma de Minas Gerais
RPGP - Rede Paraense de Genoma e Proteômica
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFPA - Universidade Federal do Pará

Siglas

µg - micrograma
µL - microlitro
2D-DIGE - Eletroforese bidimensional de fluorescência diferencial
2-DE - Eletroforese bidimensional
ACN - Acetonitrila
BHI - Infusão cérebro-coração
CyDye - *cyanine dye*
DO - Densidade óptica
G+C - Guanina+Citosina
InDel - Inserção e deleção
kDa - kilodalton
LC - Linfadenite caseosa
MALDI TOF - matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry
MQD - meio quimicamente definido
NaCl - Cloreto de Sódio
NaOH - Hidróxido de Sódio
NCBI - National Center for Biotechnology information
PLD - Fosfolipase D
TPP - fracionamento em três fases

1 APRESENTAÇÃO

1.1 Colaborações

O presente trabalho foi desenvolvido através da colaboração entre o Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Laboratório de Venenos e Toxinas (LVTA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e o Laboratório de Polimorfismo de DNA (LPDNA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA). Contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Pará (FAPESPA) e do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD).

1.2 Estrutura do manuscrito

O presente trabalho de dissertação teve como objetivo avaliar a diferença de expressão e caracterizar o exoproteoma da *Corynebacterium pseudotuberculosis* linhagem 1002 e C231, utilizando eletroforese de fluorescência diferencial 2D-DIGE, 2-DE e espectrometria de massa (MALDI TOF-TOF). Assim o manuscrito apresenta-se dividido em: (i) Introdução geral; (ii) revisão da literatura que abordará aspectos sobre a linfadenite caseosa, do seu agente etiológico *C. pseudotuberculosis* e sobre a proteômica; (iii) objetivos gerais específicos; (iv) materiais e métodos. (v) Os resultados e discussão serão abordados através de três partes: parte I detalha cultivo bacteriano, obtenção da amostra e padronização dos géis bidimensionais; parte II descreve sobre a análise de diferença de expressão entre as proteínas extracelulares das duas linhagens; parte III consta da caracterização do exoproteoma das linhagens utilizando 2-DE e espectrometria de massa; (vi) Conclusão geral e perspectivas referentes aos resultados obtidos com este trabalho. Em anexo há detalhes sobre o currículo *lattes*, artigos publicados e submetidos.

1.3 Introdução Geral

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram positiva responsável por causar doenças infecto-contagiosas em caprinos e ovinos (Linfadenite caseosa), eqüinos (Linfangite ulcerativa) bovinos e ocasionalmente no homem (PEEL et al., 1997; SELIM, 2001).

A Linfadenite caseosa (LC) é distribuída mundialmente, sendo encontrada nos países da América do Norte e do Sul, Austrália, Nova Zelândia, Europa, Ásia e África. Nestes países onde há intensa atividade na caprino e ovinocultura, a LC é considerada uma das doenças bacterianas de maior preocupação, causando sérios prejuízos econômicos e sanitários. A doença está relacionada desde condenação da carcaça e pele, à perdas na eficiência reprodutiva e na produção de carne, leite e lã (PATON et al., 1994, ARSENAULT et al., 2003; DORELLA et al., 2006).

Essa enfermidade é caracterizada pela formação de abscessos com conteúdo secos e purulentos nos linfonodos (BENTO; ZONI, 1986; COSTA, 2002; DORELLA et al., 2006). A doença manifesta-se através de duas formas: (i) externa ou superficial, caracterizada pela presença de abscessos nos linfonodos superficiais e/ou tecidos subcutâneo, e (ii) interna ou visceral caracterizada pelo desenvolvimento de abscessos em órgãos internos, tais como pulmão, rim, fígado e baço, e linfonodos viscerais (PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998; WILLIAMSON, 2001).

O principal fator de virulência da *C. pseudotuberculosis* que contribui para o mecanismo da patogenicidade da LC é a fosfolipase D (PLD), uma potente exotoxina com atividade esfingomielinase, que favorece a disseminação deste patógeno no hospedeiro (SONGER, 1997; MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007). Estudos demonstram que os genes *fad* A,B,C e D, localizados em um operon próximo ao gene *pld*, estão envolvidos na captação de ferro pela bactéria sendo importantes durante o processo de infecção (BILLINGTON et al., 2002).

Para ampliar o conhecimento sobre as bases moleculares de genes relacionados a fatores de virulência e uma melhor compreensão sobre a fisiologia bacteriana de *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002, isolada de caprino no Brasil, teve seu genoma seqüenciado e anotado, e a *C. pseudotuberculosis* linhagem C231

isolada de ovino da Austrália teve seu genoma anotado. Estes trabalhos foram desenvolvidos através da colaboração entre a Rede Genômica de Minas Gerais (RGMG) e a Rede Genômica e Proteômica do Pará o qual possibilitou informações sobre genes relacionados a diversas funções.

Com o intuito de desvendar novos fatores de virulência, potenciais candidatos a alvos vacinais e desenvolver métodos de diagnóstico, observa-se um crescente interesse por estudos comparativos entre proteínas extracelulares de linhagens bacterianas como: *Mycobacterium tuberculosis* (HE et al., 2003), *Staphylococcus aureus* (POCSFALVI et al., 2008), *Streptococcus suis* (WU; ZHANG; LU, 2008), *Listeria monocytogenes* (DONALDSON et al., 2009).

O interesse por estes tipos de proteínas se deve ao fato delas serem cruciais para a sobrevivência da bactéria durante o processo de infecção, uma vez que agem como mediadores importantes na interação patógeno-hospedeiro (WU; ZHANG; LU, 2008). São consideradas, importantes alvos para induzir resposta imunológica ou para desenvolvimento de vacinas (BARBEY et al., 2009).

Devido à riqueza de informações obtidas em estudos comparativos entre linhagens bacterianas e dados produzidos pela integração das abordagens genômicas, transcritômicas e proteômicas, nosso grupo de pesquisa vem associando estes dados para conhecimento sobre a fisiologia celular e a caracterização de novos fatores de virulência da *C. pseudotuberculosis* para serem utilizados na produção de vacinas e métodos de diagnóstico.

Através da pangenômica nosso grupo tem realizado um estudo comparativo entre 7 linhagens de *C. pseudotuberculosis* que foram seqüenciadas pela RGMG e Rede Genômica e Proteômica do Pará. Atualmente está em curso um estudo transcritômico comparativo entre duas linhagens de *C. pseudotuberculosis* submetidas à diferentes condições de estresse. Com relação à proteômica, utilizando o método TPP/LCMS^E foram caracterizadas 94 proteínas extracelulares das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 e C231 (PACHECO et al., 2011).

O estudo proteômico vem ganhando avanços com o passar dos anos e novas técnicas têm sido desenvolvidas para auxiliar na obtenção de resultados mais acurados, sendo de suma importância para o entendimento funcional de diversas proteínas (KAUSHIK; SEHGAL, 2008). Dentre estas técnicas se destaca a tecnologia de 2D-DIGE, bastante eficiente em estudos de expressão diferencial de

proteínas. Esta técnica contorna as principais desvantagens associadas ao convencional gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), tais como baixa sensibilidade e variabilidade gel-a-gel, permitindo que os estudos proteômicos quantitativos tornem-se mais precisos e sensíveis (MAROUGA; DAVID; HAWKINS, 2005).

As linhagens alvos neste estudo serão a *C. pseudotuberculosis* 1002, que tem sido modelo de estudo em vários trabalhos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa e a *C. pseudotuberculosis* C231 linhagem a qual é alvo de vários estudos na Austrália pelo grupo de pesquisa do Dr. Robert Moore que pertence ao Australian Animal Health Laboratory.

Essas linhagens são foram isoladas de espécies de hospedeiros diferentes, a linhagem 1002 de caprino e C231 de ovino, esta diferença de hospedeiro e localização geográfica pode influenciar durante o curso de infecção de cada linhagem podendo ou não, uma determinada proteína ser expressa, ou mesmo a diferença de expressão. Estas alterações podem influenciar na instalação e progressão da doença. Diferenças entre as espécies ovina e caprina, quanto à localização dos abscessos, são relatadas, com a forma visceral ocorrendo predominantemente em ovinos e a superficial em caprinos (BROWN; OLANDER, 1987). Neste contexto, este trabalho tem como objetivo caracterizar e avaliar a diferença de expressão de proteínas extracelulares da *C. pseudotuberculosis* utilizando 2-DE e 2D-DIGE.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Linfadenite caseosa

A Linfadenite Caseosa (LC) conhecida, também como “mal-do-carço”, é uma doença infecto-contagiosa crônica que acomete ovinos e caprinos por todo o mundo. A doença é caracterizada pela formação de abscessos nos gânglios linfáticos que apresentam materiais secos e purulentos (BENTO; ZONI, 1986; COSTA, 2002; DORELLA et al., 2006).

A doença pode se manifestar através da forma externa, caracterizada pelo aparecimento de abscessos em tecidos subcutâneos e nódulos linfáticos superficiais (Figura 1A, B), e na forma interna caracterizada por abscessos em órgãos internos (Figura 1C) (pulmão, rim, fígado e baço) e nódulos linfáticos internos (PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998; WILLIAMSON, 2001). Em alguns casos a infecção produz poucos sinais clínicos no animal, impossibilitando identificá-los até sua morte (PATON et al., 1994).

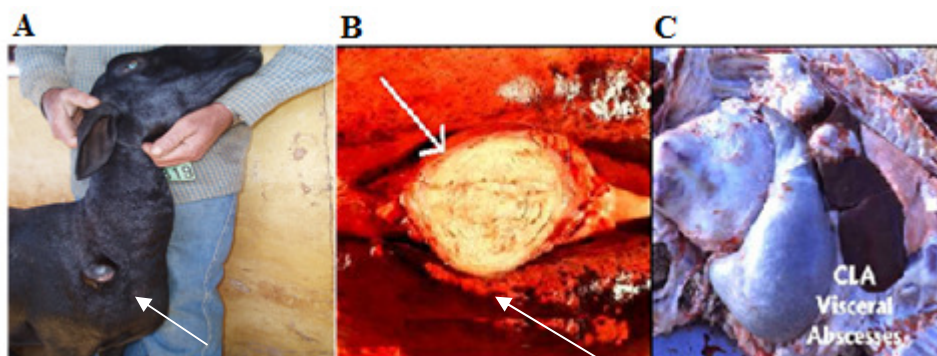


Figura 1: Formas características da LC. (A) e (B) Forma externa: caprino apresentando nódulo superficial em região pré-escapular. **(C)** Forma interna: presença de abscesso em órgão interno. Acometimento de vísceras.

2.1.2 Impactos sócios econômicos

A LC causa anualmente perdas significativas, principalmente para os produtores de rebanhos de caprinos e ovinos. Uma vez infectado, o animal apresenta perda de peso, lã, produção de carne e leite, além da condenação da carcaça e a deterioração da pele (PATON et al., 1994; ARSENAULT et al., 2003).

A caprinocultura e a ovinocultura têm presença importante no agronegócio brasileiro. Em 2004, a produção nacional de peles de caprinos e ovinos foi de 5.106 toneladas e 18.500 toneladas, respectivamente, tem sido exportadas para a União Européia 300 toneladas de peles de ovinos, contabilizando US\$ 524 mil dólares (IEA, 2005).

No entanto, a instalação da LC nos rebanhos brasileiros acarreta sérios prejuízos econômicos. No Estado da Bahia, onde se concentra a maior parte do rebanho nacional de caprinos (33,7%), o prejuízo causado pela incidência da doença é estimado em aproximadamente R\$ 4 milhões de reais por ano (OLIVEIRA, 2007).

Na Austrália onde há uma intensa atividade na ovinocultura a presença da LC nos rebanhos acarreta uma perda anual de aproximadamente US\$ 17 milhões de dólares.

2.1.2 Epidemiologia

A LC é distribuída mundialmente e observa-se uma alta prevalência em países onde a ovino e caprinocultura é intensa, como Austrália, Nova Zelândia, em alguns países da Europa, América do Norte, Brasil, África do Sul e Oriente Médio (BAIRD; FONTAINE, 2007; DORELLA et al., 2006).

O Brasil é o oitavo maior criador de ovinos e caprinos do mundo com cerca de 16 milhões e 10,3 milhões de cabeças, respectivamente, de acordo com dados do Anuário da Pecuária Brasileira de 2005. A maior concentração dos rebanhos está na região Nordeste, com cerca de 50% dos ovinos e 90% dos caprinos (RTS, 2007).

Por possuírem a maior concentração de rebanhos caprinos do país os estados da região Nordeste são os mais afetados, devido à deficiência das condições sanitárias nos criadouros (RIBEIRO et al., 2001). Na Bahia a incidência da LC nos rebanhos de caprinos é em torno de 30%, e aproximadamente 20% do rebanho caprino da Bahia estão infectados com a *C. pseudotuberculosis* (OLIVEIRA, 2007). Em um estudo realizado no Ceará 66,9% dos caprinos avaliados apresentaram sinais clínicos da doença (PINHEIRO et al., 2000).

Langenegger & Langenegger, (1991) analisaram a prevalência da LC em rebanhos de caprinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro, a pesquisa revelou que

em 23% dos rebanhos a enfermidade estava presente, com a incidência variando entre 36 a 100%. Um estudo realizado em 200 propriedades do estado de Minas Gerais revelou uma soroprevalência da LC em 70% dos ovinos e 80% dos caprinos (GUIMARÃES et al., 2009; SEYFFERT et al., 2010a).

Quando se analisa o fator hospedeiro a prevalência da doença apresenta variações, sendo mais freqüente em ovinos se comparada a caprinos; contudo, nas duas espécies, a patologia é mais observada em animais adultos. Em alguns países onde os animais são criados em sistema intensivo, a taxa da prevalência em animais mais velhos é acima dos 80% (RADOSTITS; GAY; BLOOD, 2002).

2.1.3 Transmissão

A principal fonte de infecção são abscessos que supuram e contaminam o ambiente, uma vez que a *C. pseudotuberculosis* pode permanecer no solo por até oito meses, contribuindo para a disseminação entre rebanhos (ALVES; PINHEIRO; PIRES, 1997).

Em caprinos ou ovinos a transmissão pode ocorrer por contato direto com secreções e por materiais contaminados pelo material purulento de linfonodos ou de descargas oro-nasais de animais com pneumonia. A entrada da bactéria no organismo é facilitada por lesões na pele, contudo, pode penetrar até mesmo na pele intacta (WILLIAMSON, 2001; DORELLA et al., 2006).

Os principais fatores de risco para o contágio da doença são a falta de higiene das instalações, o contato direto entre animais infectados, a poeira e a tosquia (RIBEIRO et al., 2001; WILLIAMSON, 2001). Em bovinos e bufalinos, há evidência de transmissão da bactéria por mosca doméstica e outros dípteros (BRAVERMAN, 1999; SELIM, 2001).

A infecção em humanos parece ser um evento raro sendo que o contágio da doença é caracterizado como zoonose ocupacional, mas há relatos descritos que a enfermidade pode ocorrer por meio da ingestão de carne caprina crua e leite de ovinos contaminados (SCHREUDER; TER-LAAK; DE GEE, 1990; MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997).

A sintomatologia no ser humano envolve a presença de linfadenopatia e outros sintomas característicos (PEEL et al., 1997; ROMERO-PÉREZA; SUÑER-MACHADO; BATISTA-DÍAZ, 2004). O primeiro caso foi descrito em 1966 no Panamá (LÓPEZ; WONG; QUESADA; 1966), atualmente há registro de aproximadamente 25 casos relatados na literatura mundial sendo a maioria proveniente da Austrália (PEEL et al., 1997).

Estudos demonstram que em 67% dos casos em humanos, os pacientes infectados são tratados com antibióticos, apresentando boa resposta ao tratamento e os nódulos linfáticos afetados são removidos cirurgicamente (PEEL et al., 1997; JOIN-LAMBERT et al., 2006; HÉMOND et al., 2008).

2.1.4 Patogenia

Ao penetrar no hospedeiro através da pele, feridas superficiais ou membrana mucosa, *C. pseudotuberculosis* é capturada por neutrófilos e fagocitada por macrófagos (BATEY, 1986). Após a fagocitose, o fagossomo se funde ao lisossomo e a bactéria continua a se multiplicar dentro dos fagolisossomos, levando à degeneração e morte celular dos macrófagos (BATEY, 1986; JONES; HUNT; KING, 2000).

A ineficiência dos macrófagos em eliminar a bactéria é atribuída à presença da camada lipídica na parede celular, e a incapacidade destes de produzir óxido nítrico (JOLLY, 1966). Alguns estudos demonstram que a PLD também atua na inativação de macrófagos (MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007). Com a morte das células do sistema imunológico, há liberação da bactéria e a formação de uma lesão necrótica (JONES et al., 2000).

Com as bactérias liberadas há o início de um novo ciclo, neste estágio ocorre a produção da enzima PLD, que irá agir nas células endoteliais dos capilares linfáticos aumentando a permeabilidade vascular, favorecendo a disseminação bacteriana para diversos órgãos e células (CARNE; ONON, 1978; SONGER, 1997; MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007).

Na tentativa de conter e eliminar o microrganismo, ocorre a formação de granulomas que vão sofrendo necrose à medida que a lesão progride, formando uma lesão caseosa com aspecto de massa esférica laminada como as camadas de

uma cebola, o que vai gerar o aspecto macroscópico desta patologia (JONES et al., 2000).

2.1.5 Tratamento

As medidas de tratamento para a LC são: (i) o uso de antibióticos não sendo esta, no entanto, uma estratégia muito viável pelo custo elevado e a incapacidade de penetração na cápsula dos abscessos (STANFORD et al., 1998; OLSON et al., 2002; RADOSTITS et al., 2002), (ii) a drenagem de linfonodos superficiais acometidos; contudo esta estratégia não elimina 100% das bactérias, e se torna inviável quando linfonodos e órgãos internos estão acometidos (ALVES; PINHEIRO; PIRES, 1997; WILLIAMSON, 2001).

Além disso, o mau manejo durante a drenagem pode gerar contaminação ambiental com o patógeno, pois a quantidade de bactéria liberada por um único abscesso é capaz de infectar todo o rebanho, devido à capacidade que esta bactéria possui de permanecer no solo. Portanto, o controle e a prevenção são estratégias mais viáveis para evitar o contágio da doença (ALVES; PINHEIRO; PIRES, 1997).

2.1.6 Medidas profiláticas

Como não existe um tratamento efetivo contra a LC, faz-se necessário o uso de medidas profiláticas para tentar conter essa doença por meio de boa higienização das instalações, remoção cirúrgica dos abscessos superficiais e a inspeção periódica de todos os animais do rebanho. Sempre que possível separar os animais com abscessos; tosquiar os ovinos jovens antes dos adultos, tratar e desinfetar o umbigo dos animais recém-nascidos, com iodo a 10% (ALVES; PINHEIRO; PIRES, 1997; DORELLA et al., 2006, WILLIAMSON, 2001).

Diversas estratégias vacinais contra *C. pseudotuberculosis* foram testadas, Brown et al. (1986) realizaram um estudo com a exotoxina PLD inativada para vacinação de cabras onde a vacina impediu a disseminação da bactéria no hospedeiro, mas não preveniu a formação de abscessos.

Alves & Olander, (1998) avaliaram a eficácia de uma vacina de toxóide da exotoxina PLD da *C. pseudotuberculosis*. Um grupo de caprinos foi imunizado com esta vacina, por via subcutânea, sendo também desafiado por via intradérmica. Os resultados macroscópicos demonstraram que a vacina reduziu a multiplicação e a disseminação da *C. pseudotuberculosis* do sítio primário de infecção, reduzindo a extensão da doença.

Hodgson et al. (1999) desenvolveram uma vacina de DNA, inativando a exotoxina PLD através de mutação sitio-específica. Após o desafio experimental apenas 44% dos ovinos desafiados obtiveram proteção. Chaplin et al. (1999) construíram e testaram uma vacina atenuada da PLD, sendo apresentada como vacina de DNA na imunização de ovinos, com o objetivo de aumentar a resposta humoral. Porém somente uma proteção parcial contra o desafio experimental com a bactéria foi obtida.

Apesar de várias tentativas vacinais, todas apresentam uma proteção contra o desafio por *C. pseudotuberculosis*, mas a eficácia ainda é variada, demonstrando a necessidade de mais estudos para obter uma possível vacina que permita uma imunidade protetora eficaz.

2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico se baseia essencialmente na observação macroscópica dos abscessos superficiais formados. O diagnóstico definitivo é obtido a partir do isolamento da bactéria diretamente do material purulento de linfonodos e a utilização da cultura bacteriológica, seguida por testes bioquímicos. Esse é um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico (RIBEIRO et al., 2001; WILLIAMSON, 2001).

Cetinkaya et al. (2000) desenvolveram um ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o gene 16S rRNA, gene muito utilizado em estudos taxonômicos microbianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de LC em caprinos e ovinos, no entanto, apesar dos resultados obtidos, o teste apresentou algumas limitações: (i) dependência da cultura bacteriológica e (ii) incapacidade de

distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans*. Este fato pode ser atribuído a alta similaridade genômica entre estas duas bactérias.

Com o intuito de obter um diagnóstico mais rápido e eficiente para detectar *C. pseudotuberculosis*, o nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) desenvolveu um ensaio de multiplex PCR, utilizando o DNA extraído diretamente de amostras clínicas e utilizando os seguintes genes como alvos da reação: 16S rRNA gene conservado em gêneros bacterianos, *rpoB* gene relacionado a estudos filogenéticos de microrganismos dos gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* e o gene *pld* que codifica a exotoxina, sendo exclusivo tanto de *C. pseudotuberculosis* quanto de *C. ulcerans* (PACHECO et al., 2007).

Este teste demonstrou boa especificidade analítica sendo capaz de distinguir *C. pseudotuberculosis* de *C. ulcerans* e obteve uma sensibilidade de 94,%, demonstrando a eficácia diagnóstica. Estes resultados equivalem aos mesmos obtidos com o teste bacteriológico que o padrão ouro, ou seja, o teste referência (PACHECO et al., 2007).

Diversas estratégias sorológicas foram desenvolvidas para tentar estabelecer um diagnóstico subclínico eficaz no combate a LC como: teste de aglutinação direta (AWAD, 1960); teste de inibição de hemólise sinérgica (BROWN et al., 1987); fixação do complemento (SHIGIDI, 1979); hemaglutinação indireto (SHIGIDI, 1979); imunodifusão (BURREL et al., 1980); teste de pele (ALVES; OLANDER, 1999); micro-aglutinação (MENZIES; MUCKLE, 1989); Dot-blot (PRODHAN et al., 1993).

Ensaio de ELISA utilizando vários componentes bacterianos como antígenos foram avaliados na tentativa de se obter um diagnóstico subclínico eficiente (SUTHERLAND et al., 1987; DERCKSEN et al., 2000; KABA et al., 2001; CARMINATI et al., 2003; BINNS et al., 2007).

Entretanto estes testes apresentam pouca especificidade e reações cruzadas resultando em resultados falsos positivos. Estas observações demonstram a necessidade de buscar novos candidatos a antígenos que não apresentem os problemas citados para que possam ser utilizados no diagnóstico eficaz para LC.

2.2 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

2.2.1 Aspectos microbiológicos

C. pseudotuberculosis é um patógeno Gram-positivo, intracelular facultativo, não-capsulado, que não esporula, imóvel e que possui fímbrias. Esse microrganismo apresenta sob a forma de coco bacilos pleomórficos medindo entre 0,5 a 0,6 µm por 1,0 a 3,0 µm de tamanho e observa-se um crescimento em forma de agrupamento em paliçada. É uma bactéria anaeróbia facultativa, mesófila, tendo um crescimento ótimo a 37 °C em pH entre 7,0 e 7,2 (DORELLA et al., 2006).

Apresenta bom crescimento em meio Infusão cérebro-coração (BHI) (COSTA, 2002). No ágar sangue tem crescimento inicialmente espaçado, que após 48h se organiza em colônias pequenas (0,5 mm de diâmetro), opacas e de coloração creme-alaranjado, com hemólise nítida (BIBERSTEIN et al., 1971).

Em meio de cultura MacConkey as colônias inicialmente possuem cor creme e após 48h tornam-se rosa metacromáticas (OLIVEIRA, 2007). Em meio líquido ocorre a formação de uma película na superfície do tubo, sem turvação do meio. Esta película é desfeita pela agitação, tendo a formação de flocos que se precipitam (MUCKLE; GYLES, 1982).

A parede celular bacteriana apresenta grande quantidade de material lipídico. O peptideoglicano da parede baseia-se no ácido mesodiaminopimérico (meso-DAP). Uma quantidade notável de cadeias curtas de ácido micólico também é encontrada (PUECH et al., 2001).

C. pseudotuberculosis apresenta reações bioquímicas tais como: catalase e urease positiva, oxidase negativa e beta-hemólise. São fermentadoras de carboidratos, sem produção de gás, através de muitas fontes como: maltose, manose, glicose, galactose e sacarose (COSTA, 2002).

A redução de nitrato é variável, sendo atribuída à existência de dois biovars *equi* e *ovis*. As linhagens que infectam principalmente eqüinos (biovar *equi*) são redutoras de nitrato a nitrito e as linhagens que infectam caprinos e ovinos (biovar *ovis*) são nitrato negativas (SONGER et al., 1988). As características bioquímicas da *C. pseudotuberculosis* podem ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1: Características bioquímicas da *C. pseudotuberculosis*.

Características bioquímicas	Produção de ácido	Características bioquímicas	Hidrólise
Glicose	+	Esculina	-
Arabinose	D	Hipurato	-
Xilose	-	Uréia	+
Ramnose	-	Tirosina	-
Frutose	+	Caseína	-
Galactose	+	Fosfatase	+
Manose	+	Piramidase	-
Lactose	-	Vermelho de metil	+
Maltose	+	Redução de nitrato	d
Sacarose	D	Catalase	+
Trealose	-	Oxidase	-
Rafinose	-	Lipofilismo	-
Salicina	-		
Dextrina	D		
Amido	-		

Símbolo (+):90% ou mais são positivas; (D): 21–89% são positivas; (-):90% ou mais são negativas ou resistentes.

Fonte: Adaptado de Dorella et al., 2007.

2.2.2 Determinantes da virulência de *C. pseudotuberculosis*

2.2.2.1 Fosfolipase D

A Fosfolipase D (PLD) é uma potente exotoxina que desenvolve um papel importante na virulência da *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1999). Algumas de suas propriedades biológicas são conhecidas como: (i) lise em eritrócitos de carneiro em sinergismo com a colesterol oxidase e a fosfolipase C produzidas por *Rhodococcus equi*, (ii) hidrólise lisofosfatidilcolina e esfingomiéline, (iii) proteção de eritrócitos de carneiro da lise por hemolisina estafilocócica (esfingomiélinase) (SONGER, 1990; YOZWIAK; SONGER, 1993).

Esta exotoxina está atribuída à disseminação da bactéria, uma vez que as membranas das células de mamíferos possuem grande quantidade de fosfolipídios.

A PLD tem efeito vasogênico, lesa as células endoteliais causando micro-hemorragias e lesões vasculares, o que resulta na maior permeabilidade do vaso e conseqüentemente, na disseminação da bactéria do local da infecção primária para outros órgãos (SONGER; 1997; MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007).

O gene *pld* que codifica PLD em *C. pseudotuberculosis* foi clonado e expresso em *E. coli*, para a obtenção de uma proteína de 31,5 KDa (HODGSON et al., 1990; SONGER et al., 1990). Hodgson et al. (1992) ao gerarem mutantes de *pld*, observaram que estes foram incapazes de se disseminar no organismo do hospedeiro, além de induzirem uma resposta imunológica não satisfatória contra *C. pseudotuberculosis*. Estes resultados demonstraram a importância da PLD na virulência desta bactéria.

Foi demonstrado que a expressão desta proteína esta relacionada a alguns fatores como dependência de densidade celular, temperatura e internalização da bactéria em células fagocíticas (MCKEAN; DAVIES; MOORE, 2007).

2.2.2.2 Lipídeos tóxicos da parede celular

Os lipídios associados à parede celular de *C. pseudotuberculosis* são semelhantes ao ácido micólico de *M. tuberculosis*, mas estes não lhe conferem resistência álcool-ácido. Hard, (1975) ao realizar estudos de microscopia eletrônica, demonstrou a presença de uma camada eletrodensa externa à parede celular, atribuída a estes lipídios.

De acordo com Jolly (1966), esta camada atua no mecanismo de virulência da *C. pseudotuberculosis*, podendo conferir resistência a ação de células fagocíticas, além de possuir efeito citotóxico. A toxicidade do material lipídico foi demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias.

Ao realizar um estudo com 25 isolados de *C. pseudotuberculosis* Muckle & Gyles (1982) propuseram que existe uma relação direta entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de abscessos crônicos.

2.2.3 Suscetibilidade antimicrobiana

Muckle e Gyles (1982), ao realizarem um estudo com 26 linhagens de *C. pseudotuberculosis*, descreveram que todas foram sensíveis aos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina G e sulfametoxazol-trimetropim. Somente três linhagens foram sensíveis a neomicina, e todas as linhagens foram resistentes à estreptomicina.

Fernández et al. (2001) ao analisar corinebactérias isoladas de mastite de ovelhas encontrou um alto valor de concentração inibitória mínima (CIM) para vários agentes antimicrobianos, demonstrando que os padrões de susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* a agentes antimicrobianos variam entre os isolados obtidos das diferentes fontes.

Abreu et al. (2008) conduziram um estudo no sertão de Pernambuco tendo como objetivo avaliar a sensibilidade antimicrobiana “*in vitro*” de isolados de *C. pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa. Foram avaliados 14 antimicrobianos e os resultados demonstraram que ciprofloxacina, cloranfenicol, norfloxacina, cefazolina, amoxicilina e tetraciclina apresentaram sensibilidade acima de 90%, demonstrando que estes poderiam ser utilizados no controle da LC.

No entanto, estes resultados foram obtidos em laboratório através de estudos *in vitro*. No estudo em campo os resultados obtidos não são eficazes tornando-se uma prática difícil, devido à incapacidade destes antibióticos atravessarem a capsula granulomatosa formada pela lesão (STANFORD et al., 1998).

2.2.4 Características do genoma da *C. pseudotuberculosis*

Os genomas das *C. pseudotuberculosis* 1002 e C231, apresentam bastante similaridade, em sua composição: (i) conteúdo G+C; (ii) tamanho médio dos genes; (iii) composição de operons; (iv) densidade gênica e (v) cerca de 18% das proteínas do genoma são hipotéticas. Entretanto algumas diferenças foram observadas: (i) tamanho do genoma; (ii) número de pseudogenes e (iii) presença de genes linhagem-específicos, de um isolado em relação a outro. Com relação a estes genes, a linhagem 1002 apresenta 39 e a linhagem C231 34. Tais genes estão

relacionados a diversas funções como virulência, metabolismo, fisiologia (D'AFONSECA, 2011). As duas linhagens apresentam sete prováveis ilhas de patogenicidade, os quais estão presentes diversos fatores de virulência. Entretanto, tais fatores não estão vinculados apenas a essas regiões e encontram-se espalhados ao longo dos genomas. Dentre estes genes, os relacionados à adesão do microrganismo a células hospedeiras, foram observados sete genes na *C. pseudotuberculosis* 1002 os quais codificam subunidades fimbriais e adesinas do tipo Sdr. Já em *C. pseudotuberculosis* C231, nove desses genes foram anotados (CASTRO, 2009). Com relação à classificação das proteínas do genoma, as categorias mais expressivas estão vinculadas a processos metabólicos em ambas as linhagens (biosintéticos, celulares, primários e macromoléculas) (D'Afonseca, 2011).

2.2.5 Proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis*

As proteínas extracelulares estão relacionadas ao desenvolvimento e crescimento celular, aquisição de nutriente, e são cruciais para a sobrevivência da bactéria durante o processo de infecção (WU; ZHANG; LU, 2008). A análise de um secretoma bacteriano é uma estratégia bastante utilizada para a caracterização de fatores de virulência desconhecidos, podendo estes ser alvos imunogênicos (TROST et al., 2005).

Alguns estudos com proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* utilizando gel de poliacrilamida unidimensional (SDS-PAGE) e *Western blotting*, foram desenvolvidos. No entanto, os resultados obtidos nestes estudos demonstraram somente o peso molecular da proteína reativa frente ao soro de animais infectados, sem uma identificação da proteína reativa, e se há presença de uma única proteína ou de mais proteínas com o mesmo peso molecular (MUCKLE et al., 1990; BRAITHWAITE et al., 1993; PAULE et al., 2003).

Com o intuito de desvendar novos alvos para o desenvolvimento de diagnóstico, vacinas e marcadores moleculares contra a LC, caracterizar fatores de virulência e obter um entendimento da fisiologia da *C. pseudotuberculosis*, nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos com proteínas extracelulares utilizando diversas abordagens proteômicas.

Paule et al. (2003) estabeleceram um protocolo eficiente para extração de proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* baseado na técnica de fracionamento em três fases (TPP), associado ao cultivo da bactéria em um meio quimicamente definido (MOURA-COSTA et al., 2002) para evitar contaminação por proteínas heterólogas de meios complexos. Ao utilizarem ensaio de *Western blotting* foi possível detectar diversas proteínas com pesos moleculares entre 16 e 125 kDa, sendo estas não demonstradas em estudos posteriores.

Seyffert et al. (2010b) desenvolveram um trabalho baseado em imunoproteômica com objetivo de identificar antígenos extracelulares que fossem reativos contra o soro de caprinos infectados por *C. pseudotuberculosis*. Foram identificadas 6 proteínas extracelulares imunogênicas de *C. pseudotuberculosis*, utilizando 2-DE, *Western blotting* e espectrometria de massas (Tabela 2).

Tabela 2: Lista das proteínas identificadas na imunoproteômica

Proteína		ID/NCBI	kDa	Peptídeos identificados	Predição celular SurfG
Resuscitation-promoting RpfB	factor	ADL20574	40.22	1	E(S)
Putative secreted protein		ADL20656	24.20	2	E(S)
NlpC/P60 protein		ADL21293	37.00	1	E(S)
Putative efflux system protein		ADL21747	59.60	2	E(PSE)
Surface layer protein A		ADL20140	38.60	7	E(S)
Metalloendopeptidase-like protein		ADL20536	24.85	1	E(PSE)

kDa = peso molecular; E = extracelular; S = secretada; PSE = potencialmente exposta a superfície celular.

Pacheco et al. (2011), com o objetivo de caracterizarem o exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* realizaram um trabalho comparativo entre duas linhagens, utilizando um sistema de cromatografia acoplado ao espectrômetro de massas (LCMS^E), uma abordagem proteômica livre de gel. Foram identificadas 93 proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis*, sendo 44 proteínas comuns entre as linhagens, 26 da linhagem 1002 e 23 da linhagem C231. Os resultados obtidos com este estudo possibilitaram a identificação de proteínas relacionadas a diversas funções biológicas e a identificação de fatores de virulência.

2.3 Proteômica

Nos últimos anos com os avanços da biologia molecular, diversas informações sobre sistemas biológicos foram desvendadas, com uma variedade de projetos de sequenciamento genômicos. A partir das sequências de DNA dos genes, pode-se deduzir a sequência de aminoácidos das proteínas por eles codificadas. Porém, estes resultados revelam pouco sobre como as proteínas de um organismo operam individualmente ou em conjunto para exercer suas funções (SOUSA; FONTES; RICART, 2001).

Dentro desse contexto, torna-se importante o estudo em larga escala das proteínas por meio de estudos proteômicos. O termo proteoma foi cunhado em 1994 como uma linguística equivalente ao conceito de genoma, e utilizado para descrever o conjunto completo de proteínas que são expressas e modificadas no organismo em uma determinada condição (SIMPSON, 2002). Em contraste com estudos bioquímicos convencionais que se concentram em uma única proteína ou simples conjuntos de macromoléculas, a proteômica tem uma abordagem mais abrangente e sistemática à investigação dos sistemas biológicos (HAN et al., 2010).

A análise proteômica fornece informações valiosas sobre as alterações na síntese de proteínas, as taxas de degradação, modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína, o que aumenta a compreensão e conhecimento dos fenômenos fisiológicos para uma condição específica (PANDEY; MANN, 2000).

O estudo proteômico se divide em duas etapas: (I) para separação primeiramente são utilizadas propriedades fundamentais intrínsecas de cada proteína, como seu peso molecular, cargas líquidas e estado de ionização. Outras propriedades, como sua afinidade por certos grupos químicos ou reconhecimento por anticorpos específicos, podem ser utilizadas na tarefa de separação das diversas proteínas em colunas de afinidade ou por técnicas de imunoprecipitação, (II) a identificação da proteína é caracterizada pela obtenção da sequência de aminoácidos que a compõem, realizada através de métodos de seqüenciamento, que pode ser realizado através do método clássico de degradação de Edman ou de técnicas modernas de espectrometria de massas (O'FARREL, 1975; PANDEY; MANN, 2000; ZHU; BILGIN; SNYDER, 2003).

Atualmente com os avanços das técnicas proteômicas vem sendo possível estabelecer uma ponte entre a nossa compreensão da seqüência do genoma e comportamento celular que se engloba na genômica funcional, através do resultado obtido pela proteômica é possível validar genes, estabelecer a correlação entre o genótipo e o fenótipo (SIMPSON, 2002).

2.4 Técnicas proteômicas

2.4.1 Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas

Duas das técnicas mais utilizadas em estudos proteômicos são a eletroforese bidimensional (2-DE) e espectrometria de massas. A eletroforese bidimensional foi utilizada primeiramente por Klose, e O'Farrel em 1975.

Esta técnica baseia-se na separação de uma amostra complexa de proteínas, através de duas dimensões físico-químicas, ou seja, de dois processos. Primeiramente as proteínas são separadas pelo seu ponto isoelétrico (pI) após serem submetidas a um campo elétrico, elas migram até encontrar uma faixa de pH referente ao seu ponto isoelétrico (pI). Neste ponto as proteínas ficam com carga neutra interrompendo a migração no gel (BERKELMAN; STENSTED, 1998). Na segunda dimensão as proteínas são separadas por peso molecular através de um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), que posteriormente é corado, os *spots* excisados do gel, submetidos à digestão trípica e analisados por espectrometria de massas (ZHU; BILGIN; SNYDER, 2003).

A espectrometria de massa é uma técnica usada para medir a relação entre massa/carga (m/z) de íons na fase gasosa. Nas últimas décadas tornou-se um método valioso para identificação e caracterização de proteínas intactas e desconhecidas, interação de proteínas, determinação de modificações pós-traducionais e quantificação absoluta de proteínas (XAN; ASLANIAN; YATES, 2008; PAN et al., 2009).

O primeiro espectrômetro de massa foi desenvolvido por Thomsom (THOMSOM, 1913). Porém a aplicação dessa tecnologia na caracterização de biomoléculas só foi possível com o desenvolvimento de novas técnicas de ionização,

como MALDI (*Matrix-Assited Laser Desorption Ionization*) e ESI (*Electrospray ionization*), que ocorreram a partir da década de 1980 (FENN et al., 1989).

Basicamente a ionização do tipo MALDI é utilizada para vaporizar as moléculas dispersas em uma matriz sólida. O analito é misturado com uma matriz, a que geralmente é um composto orgânico de baixo peso molecular. A presença da matriz protege o analito de degradação, transferindo parte da energia proveniente do laser às macromoléculas, resultando em uma leve ionização que permitirá a detecção numa forma intacta (KICMAN; PARKIN; ILES, 2007; WALTHER; MANN, 2010). Quando as moléculas de matriz se desprendem, carregam parte dos analitos em um campo à vácuo que é gerado no equipamento, contribuindo para o processo de ionização da amostra (ZALUZEC; GAGE; WATSON, 1995).

A técnica de ESI se baseia no princípio da formação de um “*spray*” eletrolítico, onde os íons negativos são oxidados, aumentando a população de cargas positivas. Desta forma, o solvente evapora até que os íons sejam expelidos para fase gasosa, passa por placas carregadas, e chega ao analisador de massas (FENN et al., 1989).

2.4.2 Eletroforese bidimensional de fluorescência diferencial (2D-DIGE)

A 2D-DIGE é uma técnica que permite a visualização simultânea de duas amostras protéicas distintas em um único gel bidimensional (Figura 2) (UNLU; MORGAN; MINDEN, 1997). Previamente as amostras são pré-marcadas com fluoróforos *cyanine dye* (CyDye) designados como Cy2, Cy3 e Cy5, que emitem uma coloração diferenciada quando excitadas com comprimentos de ondas e são detectados por um *scanner* que contém um leitor de fluorescência específico (CHAKRAVARTI; GALLAGHER; CHAKRAVARTI, 2005).

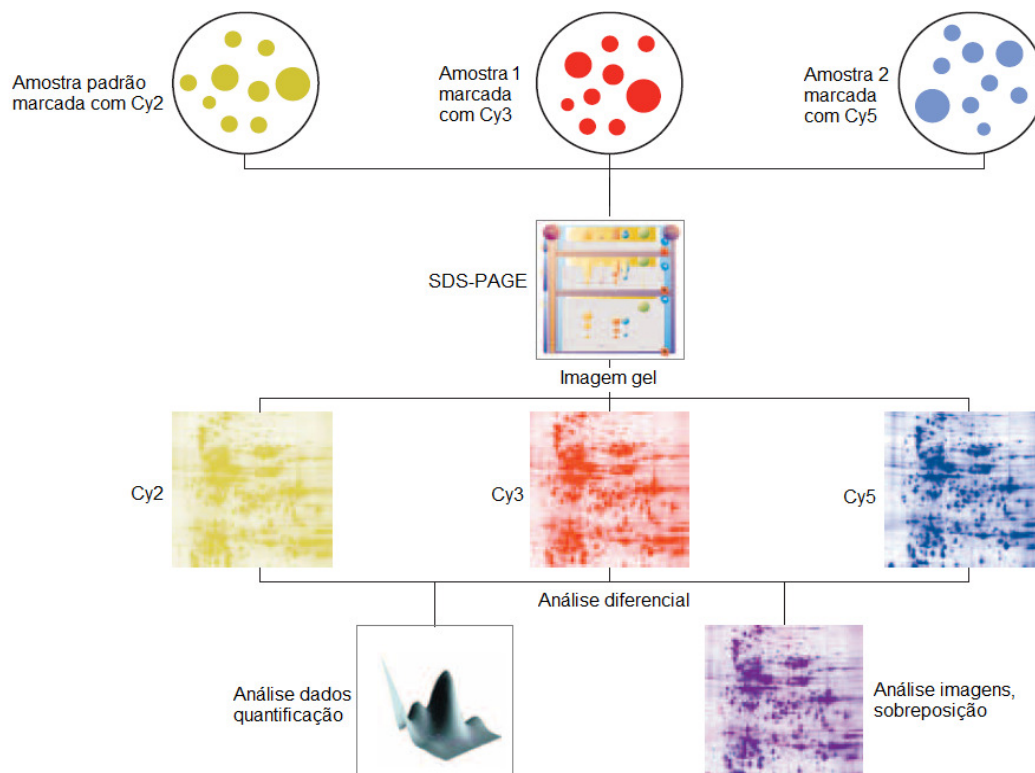


Figura 2: Representação esquemática dos passos da 2D-DIGE. Marcação das amostras com os CyDye seguido pela separação protéica por eletroforese. Análise dos géis por *software* específico gerando resultados quantitativos.
Fonte: Adaptado de *2-D electrophoresis principles and methods*, 2004.

Os CyDye DIGE oferecem uma alta sensibilidade, sendo que apenas 125 pg de amostra são necessários para detecção da fluorescência, gerando uma resposta linear para concentração de proteína de até quatro ordens de magnitude. Além disso preservam a carga do resíduo de aminoácido alvo, mantendo o ponto isoelétrico das proteínas marcadas (MINDEN et al., 2009).

Estes fluoróforos contém um grupo éster *N-hydroxysuccinimidyl* reativo que forma uma ligação covalente na cadeia lateral dos resíduos de lisina das proteínas, produzindo uma ligação amida (Figura 3). Esta ligação é mínima e ocorre em apenas 1 a 2% dos resíduos de lisina (MAROUGA; DAVID; HAWKINS, 2005).

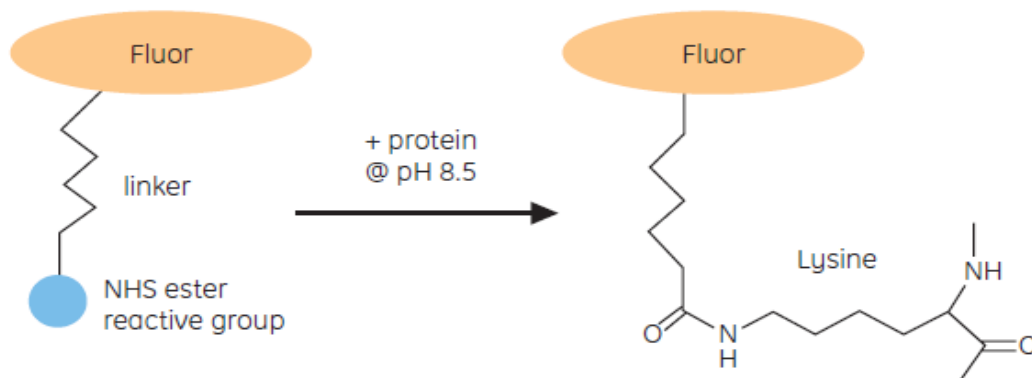


Figura 3: Representação esquemática da ligação entre CyDye com resíduo de lisina.
Fonte: Adaptado de 2-D electrophoresis principles and methods, 2004.

O grande avanço desta técnica é a realização do ensaio *multiplex* que possibilita a adição de um padrão interno que é um *pool* com quantidades iguais de cada uma das amostras experimentais comparadas. Esta amostra padrão limita a variação experimental e garante a correspondência intra e inter-gel precisas, gerando uma maior confiabilidade aos resultados, que reflete o verdadeiro efeito biológico (ALBAN et al., 2003; ISSAQ; VEENSTRA, 2008).

Com relação a 2-DE o nível de variação nos padrões de proteínas é uma das grandes desvantagens, além da baixa resolução (PETRAK et al., 2008). Com a utilização da 2D-DIGE várias amostras no mesmo gel reduzem significativamente a variação de padrão nos *spots* e reduz o número de géis em um experimento. Embora a geração de dados estatísticos requeira o uso de múltiplos géis, a capacidade de comparar duas amostras em um único gel é altamente vantajosa. Isso significa que as diferenças ou variações decorrentes da análise de diferentes amostras em géis individuais poderiam ser completamente eliminadas (VAN DEN BERGH et al., 2003).

Esta técnica tem sido aplicada em várias áreas com diversas finalidades, apresentando como alvos proteínas de diversos organismos como: plantas (KUBIS et al., 2003), bactérias (MARTINEZ-GOMARIZ et al., 2009), insetos (VIERSTRAET et al., 2004), leveduras (HU et al., 2003) e tecidos humanos (ZHOU et al., 2002).

Devido a sua alta sensibilidade e a capacidade de determinar o nível de expressão, o 2D-DIGE tem sido bastante utilizado na pesquisa de biomarcadores. Em um estudo relacionado ao câncer de esôfago, utilizando a técnica 2D-DIGE foi possível identificar 58 *spots* três vezes mais expressos e 107 *spots* menos expressos com relação a amostra controle. Após a espectrometria de massa e

ensaio de *Western blotting* foi possível demonstrar que o anticorpo contra a proteína gp96 apresentou reatividade somente em tecido tumoral em comparação com a proteína anexina I que demonstrou reação somente em tecido sadio. Estes resultados demonstram a utilidade da técnica de 2D-DIGE na identificação de biomarcadores (ZHOU et al., 2002).

A 2DE é uma técnica para lidar com lisados complexos e, simultaneamente, visualizar grande parte do proteoma. Por esta razão, o uso de novas técnicas recentemente desenvolvidas eliminaram alguns problemas relativos a 2-DE (MOROUGA; DAVID; HAWKINS, 2005). Com a implementação da 2D-DIGE, tem sido possível solucionar o problema da reprodutibilidade, permitindo comparar várias amostras em um único gel. Esta técnica é bastante promissora nos estudos de expressão diferencial (MINDEN, 2007).

2.5 Proteômica de microrganismos procariotos

Atualmente, diversos estudos em microrganismos procariotos, utilizando plataformas proteômicas, têm sido realizados com a finalidade de identificar genes ou proteínas para o melhoramento de linhagens, desenvolvimento de bioprocessos e conhecimento sobre o comportamento de proteínas em uma determinada condição fisiológica (VANBOGELEN et al., 1999; HAN et al., 2010). A análise do proteoma de um microrganismo pode ser classificado em quatro frações: proteínas totais, proteínas solúveis, as proteínas de membrana do interior e/ou membranas exteriores, e proteínas secretadas (HAN et al., 2010).

O estudo do proteoma geralmente é integrado aos dados genômicos de organismos sequenciados, que resulta na validação da anotação genômica, pela identificação das proteínas expressas das ORFs (*open reading frame*) preditas, auxiliando na determinação mais acurada das estruturas dos genomas (REEVES; TALAVERA; THORNTON, 2009). Jaffe et al. (2004) conseguiram detectar cerca de 81% das proteínas preditas na anotação de *Mycoplasma pneumoniae* e algumas ORFs não preditas pelas ferramentas de anotação comumente utilizadas, ampliando e integrando ainda mais os conhecimentos acerca do genoma e proteoma desse microrganismo.

Bactérias secretam diversas proteínas para o meio extracelular que podem estar relacionadas a fatores de virulência que auxiliam no mecanismo de patogenicidade de diversas patologias. Atualmente uma abordagem útil para identificar fatores de virulência são os estudos comparativos entre linhagens bacterianas utilizando plataformas proteômicas (WU; WANG; JENNINGS, 2008).

Pocsfalvi et al. (2008) identificaram fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* através de um trabalho comparativo entre exoproteínas de linhagens enterotoxigênicas. Três proteínas SelK, SelP e SelQ foram identificadas em nível protéico. Os genes referentes a estas proteínas já haviam sido alvos de estudo em um trabalho de expressão diferencial por ensaio de microarranjo (SERGEEV et al., 2004).

Com relação à técnica de 2D-DIGE, até o momento de acordo com a base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) existem aproximadamente 53 trabalhos com bactérias relacionadas as mais diversas finalidades (Tabela 3). Com a finalidade de identificar proteínas relacionadas a anaerobiose, foi realizado um estudo em *Salmonella enterica*, utilizando a técnica de 2D-DIGE para avaliar o nível de expressão das proteínas relacionadas ao mecanismo metabólico. Este estudo revelou a presença de 38 proteínas induzidas anaerobicamente, e a maioria está associada a enzimas da via de pentose fosfato e glicose. Outras 42 proteínas foram reprimidas e estão relacionadas ao transporte de proteínas periplasmáticas (ENCHEVA; SHAH; GHARBIA et al., 2009).

Martinez-Gomariz et al. (2009) utilizaram a 2D-DIGE para avaliar a diferença de expressão de proteínas totais de *Bacillus cereus* em resposta alta pressão hidrostática, utilizada para a conservação de alimentos. Com esta abordagem foi possível identificar 76 *spots* com diferença de expressão significativa. Após a análise por espectrometria de massa foi possível identificar 19 proteínas relacionadas a diversos processos, dentre estas a flagelina foi a proteína que mais diminuiu o nível de expressão sugerindo perda da capacidade de virulência da bactéria.

O crescente avanço das técnicas de proteômica possibilitou a realização de diversos estudos em microrganismos favorecendo um conhecimento mais abrangente sobre o comportamento fisiológico de diversas proteínas e o emprego destas no setor biotecnológico.

Tabela 3: Estudos utilizando a técnica de 2D-DIGE em procariotos

Bactéria	Objetivo do trabalho	Ano
1 <i>Escherichia coli</i>	Resposta ao tratamento com ácido benzóico	Yan et al., 2002
2 <i>Pirellula sp.</i> linhagem 1	Quantificação de proteínas relacionadas ao metabolismo de glicose	Gade et al., 2003
3 <i>Erwinia carotovora</i>	Determinar mudança significativa na expressão da proteína através da comparação <i>pair-wise</i>	Karp et al., 2004
4 <i>Erwinia carotovora</i>	Estudo de Quorum sensing	Corbett et al., 2005
5 <i>Escherichia coli</i>	Quantificação de proteínas relacionadas ao cultivo bacteriano em meios suplementados e depletados de aminoácidos.	Lopez-Campistrous et al., 2005
6 <i>Rhodopirellula báltica</i>	Avaliar a composição protéica em diferentes estágios do crescimento bacteriano	Gade et al., 2005
7 <i>Streptococcus mutants</i>	Formação de biofilme	Rathsam et al., 2005
8 <i>Synechocystis sp.</i> PCC6903	Resposta a choque térmico	Slabas et al., 2006
9 <i>Rhizobium leguminosarum</i>	Quorum sensing	Cantero et al., 2006
10 <i>Neisseria meningitidis</i>	Avaliar a diferença de expressão dos componentes protéicos de duas vacinas utilizadas contra a meningite.	Vipond et al., 2006
11 Sepse induzida pela perfuração cecal de camundongos	Identificar proteínas em urinas de ratos, após a indução de sepse para serem usadas como biomarcadores.	Holly et al., 2006
12 <i>Helicobacter pylori</i>	Avaliar proteínas que são expressas pela ilha de patogenicidade <i>cag-PAI</i>	Busler et al., 2006
13 <i>Bacillus anthracis</i>	Avaliar expressão de proteínas após Infecção de macrófagos.	Sapra et al., 2006
14 <i>Bacillus thuringiensis</i>	Identificar receptor de superfície da toxina Cry1Ac, na superfície da membrana intestinal	Jurat-Fuentes et al.,
15 <i>Erwinia carotovora</i>	Avaliar o efeito da mutação do gene ECA00020	Karp et al., 2007
16 <i>Aromatoleum aromaticum</i>	Avaliar expressão de proteínas após submissão a condições redox em meio suplementado com diferentes substratos	Wohlbrand et al., 2007
17 <i>Bacillus anthracis</i>	Avaliar o perfil protéico de linhagens	Park et al., 2007

	contendo plasmídeo px01após infecção de macrófagos e células da glia.	
18	<i>Spirulina platensis</i>	Avaliar diferença de expressão do proteoma de duas formas morfológicas da <i>S. platensis</i>
		Hongsthong et al., 2007
19	<i>Streptococcus sp</i>	Formação de biofilme
		Dige et al., 2007
20	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Resposta ao choque térmico
		Suokko et al., 2008
21	<i>Brucella suis</i>	Infecção intramacrofágica
		Al Dahouk et al., 2008
22	<i>Lactobacillus plantactarum</i>	Resposta a carbono inorgânico
		Bringel et al., 2008
23	<i>Streptococcus sp</i>	Formação de biofilme dental
		Dige et al., 2009
24	<i>Salmonella enterica</i>	Baixa tensão de oxigênio e alta osmoláridade
		Sonck et al., 2009
25	<i>Vibrio vulnificus</i>	Quantificar o proteoma após cultivo em meio suplementado e depletado de ferro
		Miyamoto et al., 2009
26	<i>Bifidobacterium longum</i>	Identificar proteínas de superfície em um ambiente biliar <i>in vitro</i>
		Ruiz et al., 2009
27	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Avaliar proteínas após o cultivo bacteriano em meio contendo antibiótico colistin
		Fernandez-Reyes et al., 2009
28	<i>Bacillus cereus</i>	Resposta a alta pressão hidrostática
		Martinez-Gomariz et al., 2009
29	<i>Synechocystis sp.</i>	Resposta ao estresse causado por pH
		Zhang et al., 2009
30	<i>Salmonella enterica</i>	Condições anaeróbicas
		Encheva et al., 2009
31	<i>Pseudomonas putida</i>	Resposta ao estresse causado por metais pesados (níquel)
		Cheng et al., 2009
32	<i>Helicobacter pylori</i>	Comparação entre linhagens oncogênica e não oncogênica
		Franco et al., 2009
33	<i>Escherichia coli</i>	Crescimento em urina humana para compreender o metabolismo bacteriano durante a infecção.
		Alteri et al., 2009
34	<i>Brucella suis</i>	Resposta após o cultivo sob baixa concentração de oxigênio
		Al Dahouk et al., 2009
35	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	Avaliar o perfil metabólico durante diferentes estágios de crescimento
		Zech et al., 2009
36	<i>Salmonella typhimurium</i>	Estudo do Quorum sensing
		Kint et al., 2009
37	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Avaliar proteínas, após o cultivo em um meio industrial e laboratorial
		Koskenniemi et al., 2009
38	<i>Listeria monocytogenes</i>	Crescimento bacteriano em monócitos THP-1
		Van de Velde et al.,

2009

39	<i>Streptococcus equi</i>	Avaliar linhagem produtora de ácido hialurônico de alto peso molecular	Marcellin et al., 2010
40	<i>Buchnera aphidicola</i>	Estudo simbiótico, meio tratado com antibiótico e baixa concentração de aminoácidos	Wang et al., 2010
41	<i>Helicobacter pylori</i>	Estudo comparativo entre linhagens isoladas de gastrite e câncer gástrico	Momynaliev et al., 2010
42	<i>Macrosiphum euphorbiae</i> e <i>Buchnera aphidicola</i>	Estudo simbiótico	Francis et al., 2010
43	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Estudo comparativo entre linhagens resistentes e não resistentes a beta-lactamase	Vashist et al., 2010
44	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Resposta após infectar <i>Caenorhabditis elegans</i> .	Bogaerts et al., 2010
45	<i>Chlorochromatium aggregatum</i>	Estudo simbiótico	Wenter et al., 2010
46	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Avaliar mudanças metabólicas e fisiológicas após mutação do gen <i>nfxB</i>	Stickland et al., 2010
47	<i>Escherichia coli</i>	Estudo comparativo entre linhagens resistentes a antibióticos piperacilin/tazobactam	dos Santos et al., 2010
48	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> e <i>Staphylococci aurei</i>	Identificar biomarcadores para meningite bacteriana	Jesse et al., 2010
49	LPS bacteriano	Resposta após a infecção de leucócitos de jacarés	Merchant et al., 2010
50	<i>Shigella flexneri</i>	Resposta ao choque térmico	Zhao et al., 2010
51	<i>Legionella pneumophila</i>	Avaliar proteínas em diferentes estágios do crescimento bacteriano	Hayashi et al., 2010
52	<i>Mycoplasma agalactiae</i>	Estudo comparativo entre a linhagem PG2 e dois isolados de campo	Cacciotto et al., 2010
53	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Influenza virus</i>	Identificar biomarcadores em amostras de sangue e urina	Presscott et al., 2010

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo realizar uma análise comparativa entre proteínas extracelulares de duas linhagens de *C. pseudotuberculosis*, avaliando a diferença de expressão através da técnica de 2D-DIGE e gerar mapas protéicos utilizando 2-DE.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter as proteínas extracelulares por meio da técnica de fracionamento em três fases.
- ✓ Identificar exoproteínas diferencialmente expressas entre as linhagens, através da 2D-DIGE.
- ✓ Caracterizar o exoproteoma das linhagens, a fim de gerar mapas protéicos utilizando a 2-DE.
- ✓ Comparar os mapas protéicos obtidos com resultados prévios utilizando LC-MS.
- ✓ Identificar as proteínas de interesse por espectrometria de massa, utilizando MALDI-TOF/TOF.
- ✓ Prever a localização sub-celular das proteínas identificadas, por meio de programas de bioinformática.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

C. pseudotuberculosis linhagem-selvagem 1002 foi cedida pelo Prof. Roberto Meyer do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade da Bahia no Brasil, e *C. pseudotuberculosis* linhagem-selvagem C231 foi cedida pelo Dr. Robert Moore do CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory na Austrália. As linhagens bacterianas foram cultivadas rotineiramente em meio infusão cérebro-coração (BHI) caldo ou ágar a 37°C. Para extração das proteínas extracelulares as linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas em meio químico definido (Tabela 4) a 37°C como descrito por Moura-Costa et al. (2002), até atingirem ponto definido do crescimento exponencial (Densidade óptica a 600nm = 1,3).

Tabela 4: Meio quimicamente definido para cultivo de *C. pseudotuberculosis*.

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

4.2 Extração das proteínas extracelulares

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

4.3(SDS-PAGE)

O preparo do gel na concentração de 12% de acrilamida-bisacrilamida foi realizado de acordo com Laemmli, (1970). A migração vertical das proteínas extracelulares ocorreu na presença do tampão de amostra em condições redutoras (Tris-HCl 0,5mol/L, pH 6,8, glicerol 10%, SDS 10% p/v, e azul de bromofenol 0,1% p/v) em sistema BioRad. Utilizou-se 10µg de proteína em cada canaleta. A migração ocorreu utilizando-se tampão de migração (Tris 0,025mol/L, glicina 0,2 mol/L, SDS 0,5%, pH 8,3) sob voltagem de 110v. O gel foi corado por Coomassie Blue G250 (NEUHOFF et al., 1988).

4.4 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Esta etapa foi realizada utilizando géis com gradiente de pH imobilizados sobre *strips* Tiras Immobiline (GE Helthcare) de tamanho constante 18cm, com intervalo de pH determinado não linear 3-10. Duzentas µg de proteínas foram

ressuspendidas em tampão de reidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, CHAPS 2%, Tris 40 mM, azul de bromofenol 0,002%, DTT 75 mM, IPG Buffer 1%). A focalização isoelétrica (IEF) foi realizada utilizando-se o aparelho IPGphor 2 (GE Helthcare), sob a seguinte voltagem 100V 1hr, 500V 2hr, 1.000V 2hr, 10.000V 3hr, 10.000V 60.000Vhr, 500V 4 hr. Após a IEF as tiras foram equilibradas por 15 min. em 10 mL de solução (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) contendo o agente redutor DTT (100mg/10mL) e posteriormente com o agente alquilante iodoacetamida (250mg/10mL). A segunda dimensão foi feita utilizando gel de poliacrilamida 12%, em sistema vertical DaltSix.

4.5 Coloração por Coomassie coloidal

Os géis foram corados por Coomassie coloidal G-250, como descrito a seguir: o gel foi fixado em solução contendo metanol 30%, ácido fosfórico 2%, por 24h. Posteriormente utilizou-se solução contendo 2% ácido fosfórico para lavar os géis que em seguida foram incubados em solução contendo 2% de ácido fosfórico, 18% de metanol e 15% de sulfato de amônio por 30 min. Após este período foi acrescentado 5 mL de solução de *Coomassie Blue* G-250 (1%), permanecendo imerso nesta solução sob leve agitação por 48 h.

4.6 Eletroforese de Fluorescência Diferencial em Gel Bidimensional (2D-DIGE)

As proteínas extraídas conforme descrito no item 4.2, foram marcadas com os fluoróforos Cy3, Cy5 e Cy2, de acordo com as instruções do fabricante (GE-Healthcare). Para permitir a análise diferencial e simultânea das proteínas provenientes de duas amostras diferentes em um mesmo gel, as amostras protéicas de cada linhagem foram coradas diferencialmente com os fluoróforos Cy3 e Cy5. Quantidades iguais de amostra proveniente de cada linhagem foram adicionadas em um tubo, resultando em um *pool* de proteínas para ser utilizado como padrão interno, que foi marcado com fluoróforo Cy2, este padrão interno é necessário para realização de análises estatísticas posteriores (Tabela 5). Após a marcação, as

proteínas foram separadas em uma primeira dimensão de acordo com seu ponto isoelétrico, utilizando para isso tiras de gel com gradiente de pH imobilizado de 3 a 10 N.L. de 18 cm (GE-Healthcare). A focalização isoelétrica (IEF) das tiras de gel foram realizadas em sistema IPGphor II (GE-Healthcare), com o seguinte programa: 100V/1hr; 500V/2hr; 1000V/2hr; 10000V/3hr; 10000V/60Vhr; 500V/4hr. Após a IEF as tiras foram equilibradas por 15 min. em 10 mL de solução (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) contendo o agente redutor DTT (100mg/10mL) e posteriormente com o agente alquilante iodoacetamida (250mg/10mL). Cada tira foi transferida para o topo de um gel de poliacrilamida homogêneo de 12% e selada com agarose. A SDS-PAGE foi feita em sistema vertical Ettan DALTsix (GE-Healthcare).

Tabela 5: Desenho experimental para a separação das amostras por 2D-DIGE.

Gel	Linhagem bacteriana	Fluoróforo	Linhagem bacteriana	Fluoróforo	Padrão interno (PI)	Fluoróforo
Gel 1	1002 (I)	Cy3	C231 (I)	Cy5	PI	Cy2
Gel 2	1002 (II)	Cy5	C231 (II)	Cy3	PI	Cy2
Gel 3	1002 (III)	Cy3	C231 (III)	Cy5	PI	Cy2

(I, II, III) Referente às extrações (replicas biológicas)

4.7 Digitalização e análise das imagens

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

4.8 Digestão triptica em gel de poliacrilamida

Os *spots* de interesse foram excisados dos géis utilizando o *Ettan Spot Picker* (GE Healthcare). Os fragmentos de gel contendo os *spots* excisados foram lavados com água destilada por 5 min. e desidratados com acetonitrila (ACN) por 20 min. sob leve agitação. Posteriormente esses fragmentos foram secos em *speed vac*. A digestão protéica ocorreu pela adição de 10 µL de uma solução estoque de tripsina (Dissolver 20 µg em 100 µL de ácido acético 50 mM (solução estoque 200 ng/µL). Diluir a solução estoque 6x com bicarbonato de amônio 50 mM (concentração final 33 ng/µL - ca. 1,5 µM).) a cada tubo durante 60 min. a uma temperatura de 4°C, após a remoção do excesso de tripsina as amostras foram incubadas em banho-maria a 58°C por 30 min. A digestão foi interrompida pela adição de 1 µL de ácido fórmico 5% (v/v). A extração dos peptídeos foi realizada utilizando 30 µL da solução ácido fórmico 5% - ACN 50% sendo as amostras submetidas à ultrasonicação. Os peptídeos foram concentrados em volume de 10 µL utilizando *speed vac* e purificados utilizando ponteiros ZIP-TIP C₁₈ (*Eppendorf*), em seguida as amostras foram estocadas a -20°C para posterior análise por espectrometria de massas (HAVLIS et al., 2003).

4.9 Espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) e busca em banco de dados

As análises por MS/MS foram feitas utilizando espectrômetro de massas MALDI TOF TOF Autoflex III™ (Brucker Daltonics, Billerica USA). O equipamento foi controlado no modo positivo/reflector utilizando o software FlexControl™. A calibração foi feita utilizando amostras de peptídeo padrão II (Angiotensin II, Angiotensin I, Substance P, Bombesin, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, Somatostatin 28, Bradykinin Fragment 1-7, Renin Substrate Tetradcapeptide porcine) (Brucker Daltonics). Os peptídeos foram adicionadas à matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, aplicados em uma placa AnchorChip™ 600 (Brucker Daltonics) e analisados no espectrômetro. Os resultados obtidos por MS/MS foram utilizados para identificação das proteínas com o programa MASCOT® (<http://www.matrixscience.com>), por comparação em bancos de dados do NCBI.

4.10 Predição da localização sub-celular das proteínas identificadas

Para realizar a predição de localização sub-celular das proteínas foram utilizados os seguintes programas SurfG+ (BARINOV et al., 2009), SecretomeP v2.0 (BENDTSEN et al., 2005a), TatP (BENDTSEN et al., 2005b), LipoP 1.0 (JUNCKER et al., 2003), SignalP (NIELSEN et al., 1997). Demais análises bioinformáticas foram realizadas utilizando o programa Blast2GO.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE I: Obtenção das amostras e padronização dos géis bidimensionais

5.1.1 Padronização do cultivo e crescimento de *C. pseudotuberculosis*

Os meios de cultura atualmente utilizados para o cultivo de *C. pseudotuberculosis* são ricos em proteínas, como os meios BHI e triptose (Moura Costa *et al*, 2002). A utilização de um meio quimicamente definido (MQD) elimina possível viés, ou seja, a presença de proteínas exógenas provenientes de meios complexos, obtendo de tal forma durante o processo de extração somente proteínas secretadas pela bactéria cultivada.

Seyffert *et al.* (2010b) ao avaliar o imunoproteoma da *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002 realizou suas extrações na fase exponencial tardia ($DO_{600nm} = 1,3$), afim de obter o mesmo padrão de proteínas este ponto foi estabelecido para as extrações neste presente trabalho. Pacheco *et al.* (2011) na caracterização do exoproteoma das linhagens 1002 e C231 realizou suas extrações no início da fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,4$).

Para avaliar se o crescimento das linhagens era equivalente, foram feitas curvas de crescimento bacteriano em triplicatas (Figura 4). O resultado demonstrou que as linhagens apresentaram crescimento semelhante.

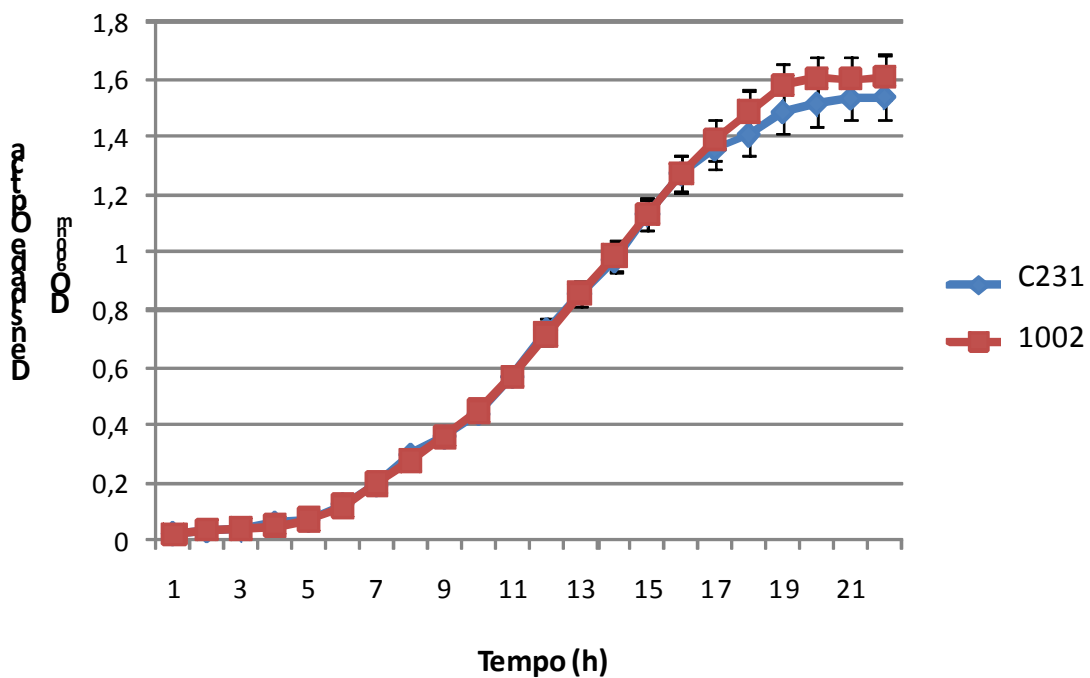


Figura 4: Curva do crescimento de *C. pseudotuberculosis* linhagem C231 e 1002 em MQD. As linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram diluídas (1:100) em MQD a 37°C. As medidas de densidade óptica a 600nm foram realizadas a cada 1h.

5.1.2 Avaliação da qualidade das proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis*

As proteínas extracelulares foram extraídas utilizando a técnica de TPP como descrito anteriormente. Após a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1972), a partir do qual se obteve uma concentração de 1,31; 1,31 e 1,33 mg/ml para proteínas da linhagem 1002 e 1,51; 1,53 e 1,55 mg/ml para proteínas da linhagem C231, estes resultados são referentes as replicas biológicas. Foi preparado um gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) para verificar a qualidade das amostras. O perfil eletroforético das triplicatas biológicas demonstrou a presença de proteínas em boa qualidade, ou seja, sem a presença de artefatos de degradação (Figura 5). Estas amostras foram utilizadas para todos os experimentos.

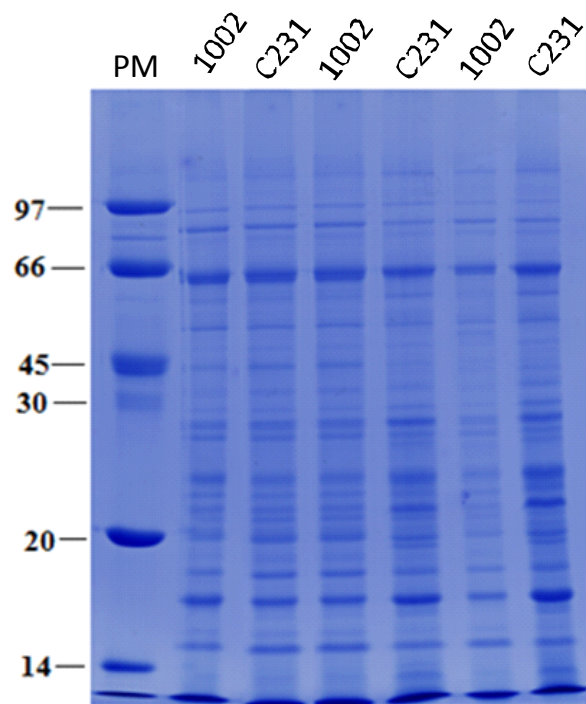


Figura 5: Perfil eletroforético das proteínas extracelulares das linhagens de *C. pseudotuberculosis*. O perfil eletroforético demonstra a separação do extrato protéico referente as replicas biológicas de cada linhagem.

5.1.3 Padronização dos géis bidimensionais

Após a determinação da qualidade das amostras teve início o processo de padronização dos géis bidimensionais. Inicialmente foram preparados géis bidimensionais utilizando tiras com faixa de pH entre 3-5.6 N.L de acordo com Seyffert et al. (2010b), para cada linhagem (Figura 6 A e B). Após a resolução eletroforética pôde-se observar diferença entre o proteoma extracelular das linhagens.

Apesar da maioria das proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* se concentrarem na faixa de pH 3-5, com o intuito de avaliar uma gama maior de proteínas, ou seja, analisar proteínas presentes tanto na faixa de pH ácida quanto básica, os géis bidimensionais foram preparados utilizando tiras de 18 cm com intervalo de pH 3-10 (Figura 7 A e B), o que resultou na visualização de *spots* na parte do gel correspondente à faixa básica.

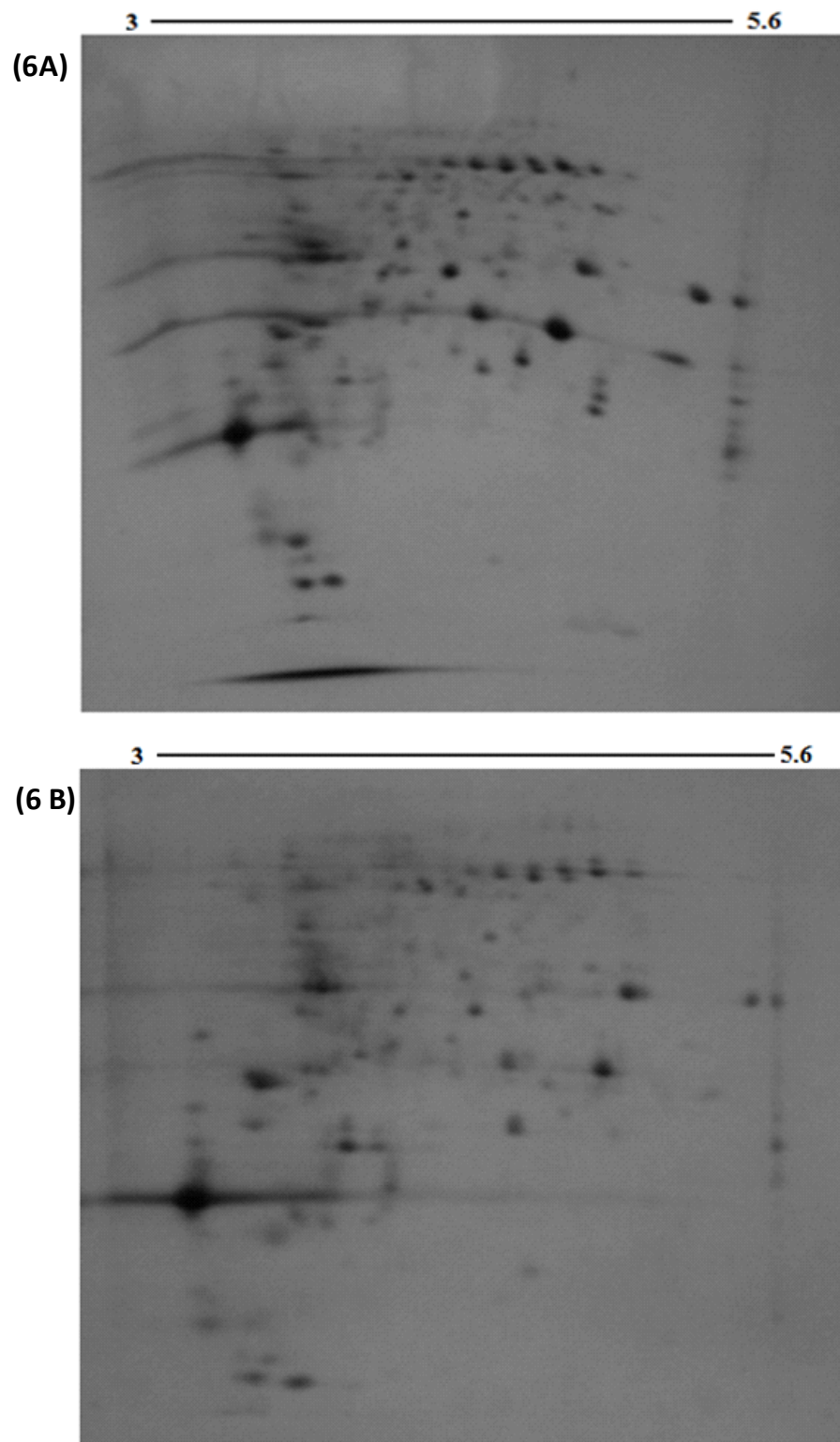


Figura 6: 2-DE da matriz extracelular de *C. pseudotuberculosis*: (A) linhagem C231 e (B) linhagem 1002, utilizando tiras de 11 cm com intervalo de pH 3-5.6 N.L. Foram utilizados 150 µg de proteína.

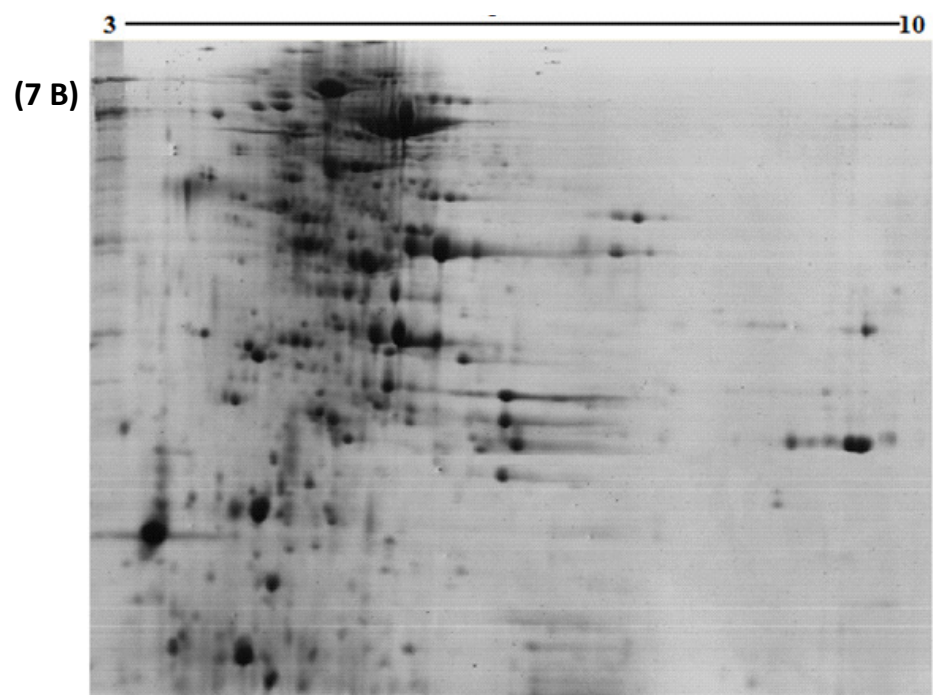
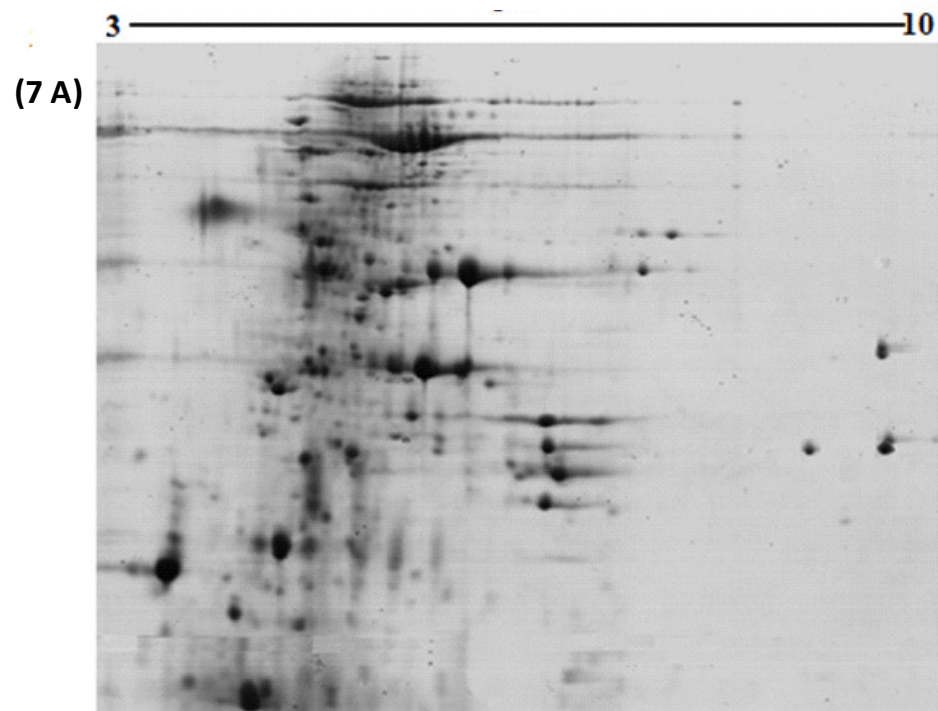


Figura 7: Perfil eletrofóretico das proteínas extracelulares das linhagens 1002 e C231. (A) linhagem C231 e (B) linhagem 1002, utilizando tiras com faixa de pH 3-10N.L. Foram utilizados 230 µg de proteínas extracelulares.

5.1.4 Conclusões da parte I

- ✓ As linhagens demonstraram bom crescimento em MQD e foi padronizado o ponto ($DO_{600nm} = 1,3$) da fase de crescimento para extrair as proteínas.
- ✓ A técnica de particionamento em três fases mostrou-se eficiente para obtenção das amostras.
- ✓ A padronização dos géis bidimensionais utilizando tiras com faixa de pH 3-10, mostrou a presença de *spots* na parte básica do gel o que permitirá a análise de uma gama maior de proteínas.

5.2 PARTE II: Análise da expressão diferencial das proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* por eletroforese bidimensional de fluorescência diferencial (2D-DIGE)

5.2.1 Eletroforese bidimensional de fluorescência diferencial

Com a determinação da qualidade da amostra, padronização dos géis bidimensionais, o próximo passo foi a realização da 2D-DIGE, para avaliar a diferença de expressão das proteínas entre as linhagens. Para cada conjunto de réplica biológica foi preparado um gel como descrito no item 4.4, o que possibilitou a análise estatística. Devido alta sensibilidade desta técnica foram utilizados 50µg de cada amostra, marcadas com 400pmol de *CyDye*. Foram utilizadas tiras de pH 3-10 N.L. Após a SDS-PAGE os géis foram digitalizados, e as imagens foram geradas utilizando *software Image Quant TL* (GE Healthchre) (Figuras 8; 9; 10 e 11).

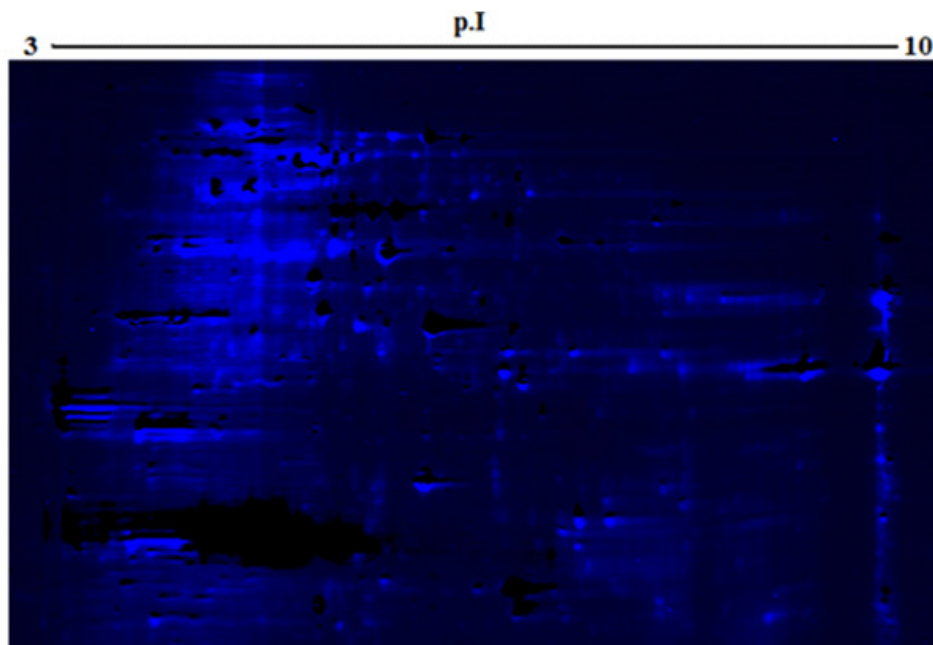


Figura 8: 2D-DIGE das proteínas extracelulares, padrão interno. Padrão interno *pool* de proteínas extracelulares obtidas das duas linhagens, marcadas com Cy2.

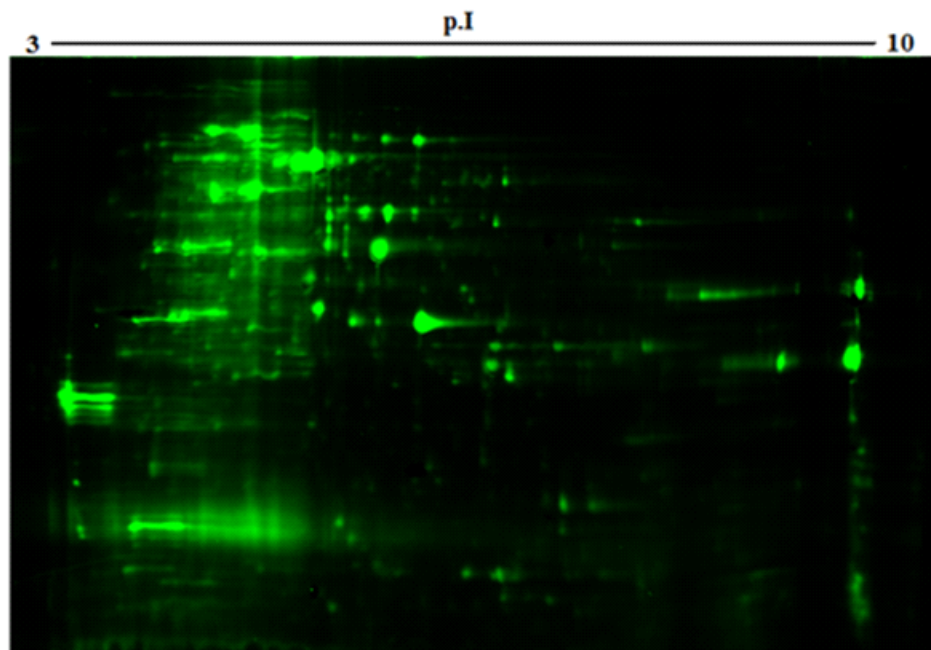


Figura 9: 2D-DIGE das proteínas extracelulares, da linhagem C231.
Proteínas extracelulares da *C. pseudotuberculosis* C231 marcadas com Cy3.

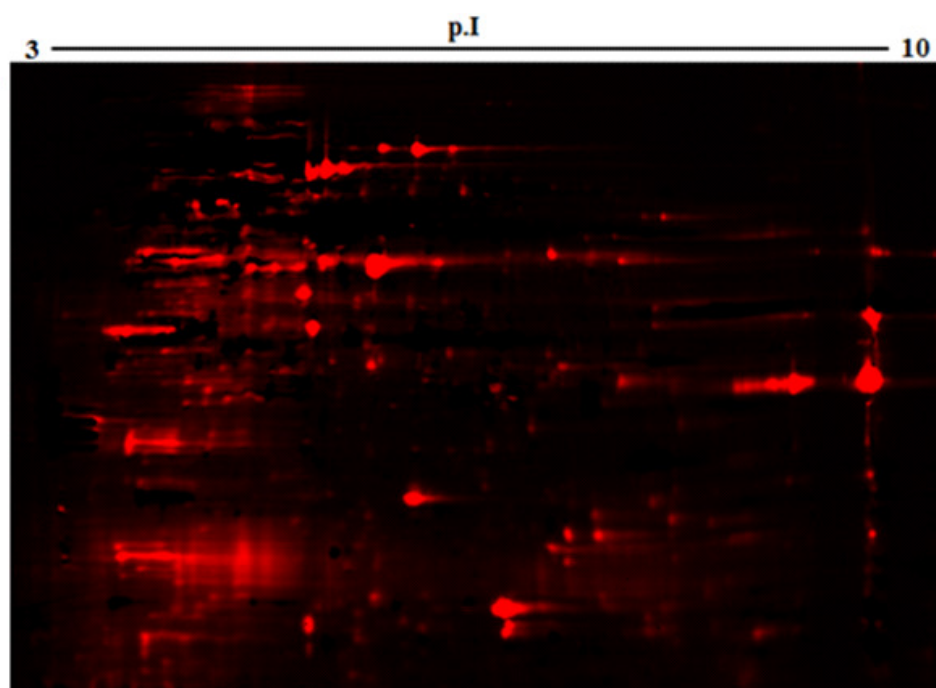


Figura 10: 2D-DIGE das proteínas extracelulares, da linhagem 1002.
Proteínas extracelulares da *C. pseudotuberculosis* 1002 marcadas com Cy5.

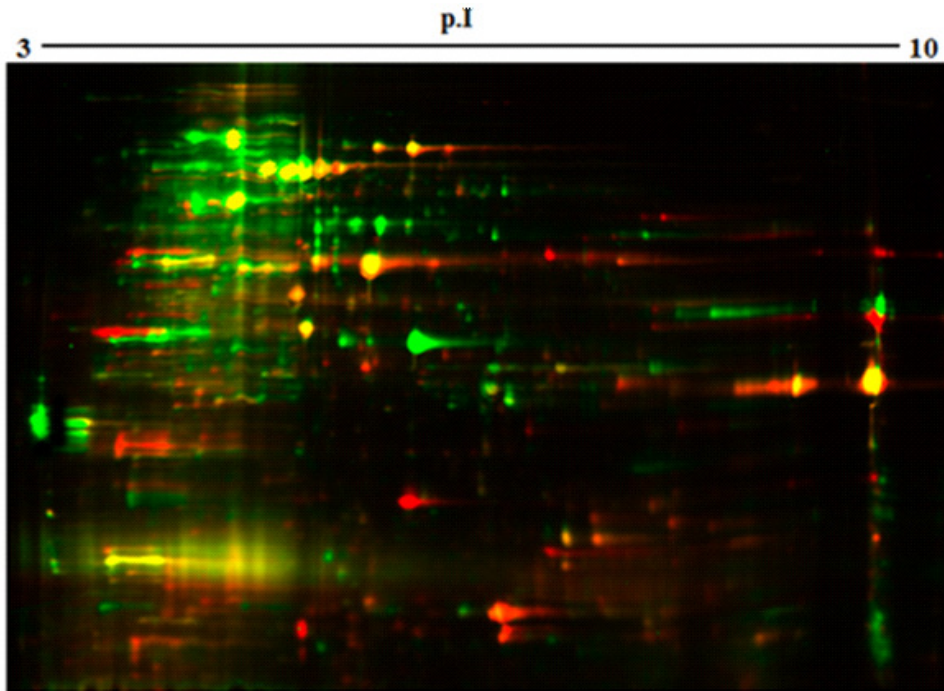


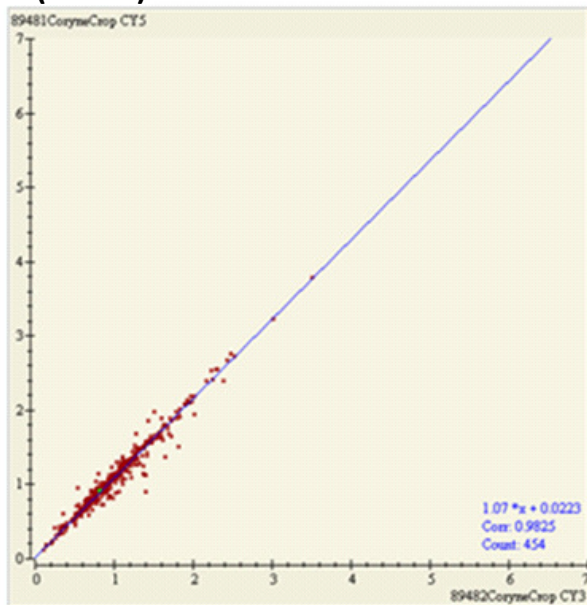
Figura 11: 2D-DIGE sobreposição das imagens. Detecção simultânea de uma migração das três amostras com os respectivos *CyDye*. Verde = linhagem C231; vermelho = linhagem 1002; amarelo = comum em ambas as linhagens.

5.2.2 Avaliação da qualidade das réplicas biológicas

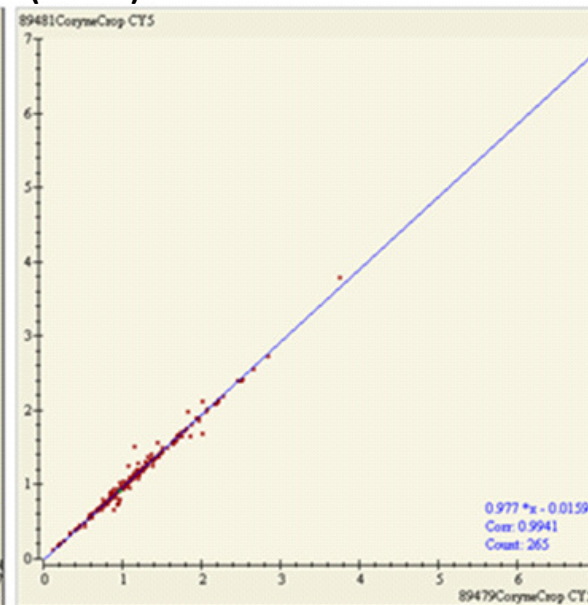
A avaliação entre a qualidade das réplicas biológicas, qualidade dos géis, semelhanças entre os géis ou variações experimentais foi analisada através de gráficos de dispersão gerados pelo programa *Image Master Platinum 7* (GE Healthcare). As amostras foram avaliadas em duplicatas, sendo que uma amostra foi tida como padrão para comparação com as demais amostras (Figura 12 A e B). Cada gráfico demonstra a correlação dos valores de *spot* por porcentagem de volume (%vol) de 2 géis, através da dependência linear entre os valores dos *spots* de um gel (variável X) e os valores correspondentes do gel de referência (variável Y).

O coeficiente de correlação obtido foi bem próximo de 1, ou seja, os valores de %vol de um *spot* de um gel pode ser predito, até um determinado ponto, pelos valores dos *spots* do outro gel. Esses resultados demonstram que os géis apresentaram reprodutibilidade biológica e experimental.

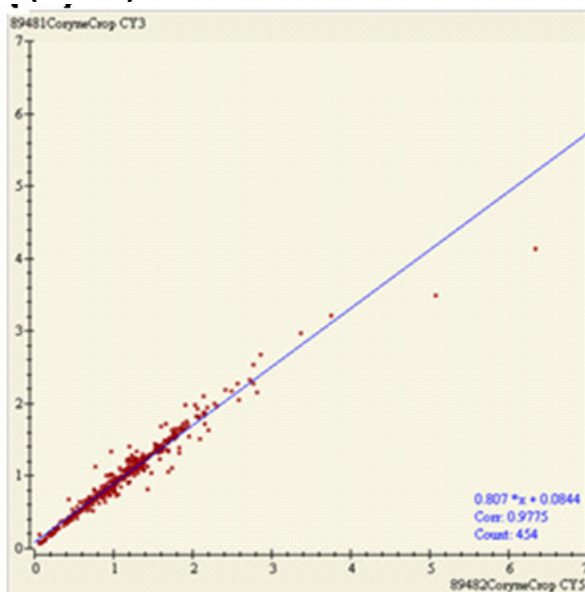
(12 A.1)



(12 A.2)



(12 B.1)



(12 B.1)

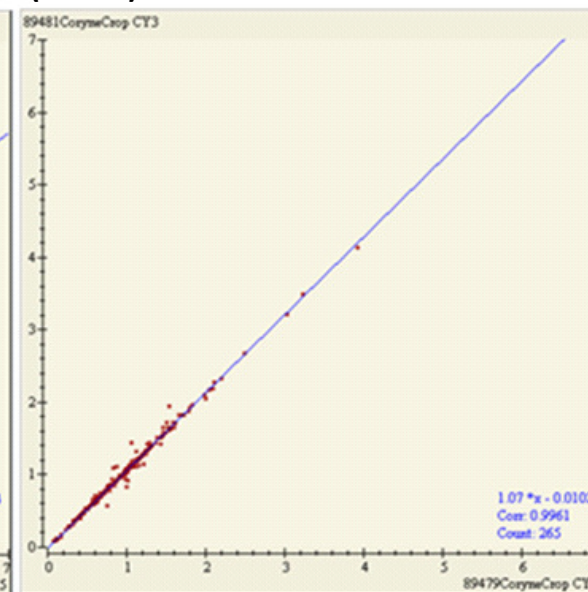


Figura 12: Gráficos de dispersão das replicas biológicas: As três amostras obtidas da extração de proteínas de cada linhagem são comparadas em duplicatas representadas pelos gráficos. **(12 A.1)** análise das proteínas da linhagem 1002, amostra 1 em comparação a amostra 2 e **(12 A.2)** amostra 1 em comparação com amostra 3; **(12 B.1)** análise das proteínas da linhagem C231, amostra 1 em comparação a amostra 2 e **(12 B.2)** amostra 1 em comparação com amostra 3. Resultado expresso pela equação de regressão, coeficiente de correlação e o número de *matches*.

5.2.3 Detecção e análise da expressão diferencial das proteínas marcadas

Após as imagens serem geradas pelo *scanner Ettan DIGE Imager* (GE-Healthcare), os três diferentes *CyDyes* detectados em cada gel foram analisados

pelo programa *Image Master Platinum 7* (GE Healthcare). A normalização foi estabelecida em relação ao *pool* padrão (Cy3 x Cy2 e Cy5 x Cy2). O volume dos *spots* foi avaliado atribuindo a soma total de *pixels* dentro dos limites de cada *spot*.

Foram detectados 47 *spots* diferencialmente expressos, 19 na linhagem 1002 e 28 na linhagem C231. Entretanto para a análise estatística foi utilizado o módulo *Class Analysis* para combinar os *spots* dos diferentes géis de cada linhagem. A expressão diferencial foi correlacionada de acordo com teste estatístico ANOVA ($p \leq 0,05$) e que apresentassem o valor de RATIO ($\geq 1,5$). Nessas condições 25 *spots* apresentaram diferença estatística significativa. Foi observado que 14 *spots* foram mais expressos na linhagem C231 e 11 *spots* foram mais expressos na linhagem 1002.

5.2.4 Identificação das proteínas

Após as análises das imagens, os *spots* diferencialmente expressos que correlacionados com os géis corados com *Coomassie Blue* G250, foram excisados e submetidos à digestão trípica para identificação por espectrometria de massa utilizando MALDI-TOF MS/MS. Dos 25 *spots* detectados como diferencialmente expressos significativamente ($p \leq 0,05$) e valor de RATIO ($\geq 1,5$), apenas dez proteínas foram identificadas, cinco proteínas apresentaram mais expressas na linhagem 1002 e cinco na linhagem C231, foram identificadas 5 proteínas com funções desconhecidas (Tabela 6). Os *spots* correspondentes às proteínas identificadas podem ser visualizados na Figura 13. Este baixo rendimento na identificação é relatado em diversos trabalhos, uma vez que grande parte dos *spots* detectados como diferencialmente expressos, quando corados por *Coomassie coloidal*, apresentam-se com intensidade bem fraca indicando pouca proteína. Além disso, este evento pode estar relacionado à sensibilidade limitada do espectrômetro de massa utilizado, pouca quantidade de proteína, ainda que possam ser reveladas por fluorescência, não são suficientes para identificação por espectrometria de massa no MALDI-TOF/TOF (SPEICHER; HARPER; RATCSAM et al., 2005; SPEICHER, 2000; TANNU; HEMBY, 2006).

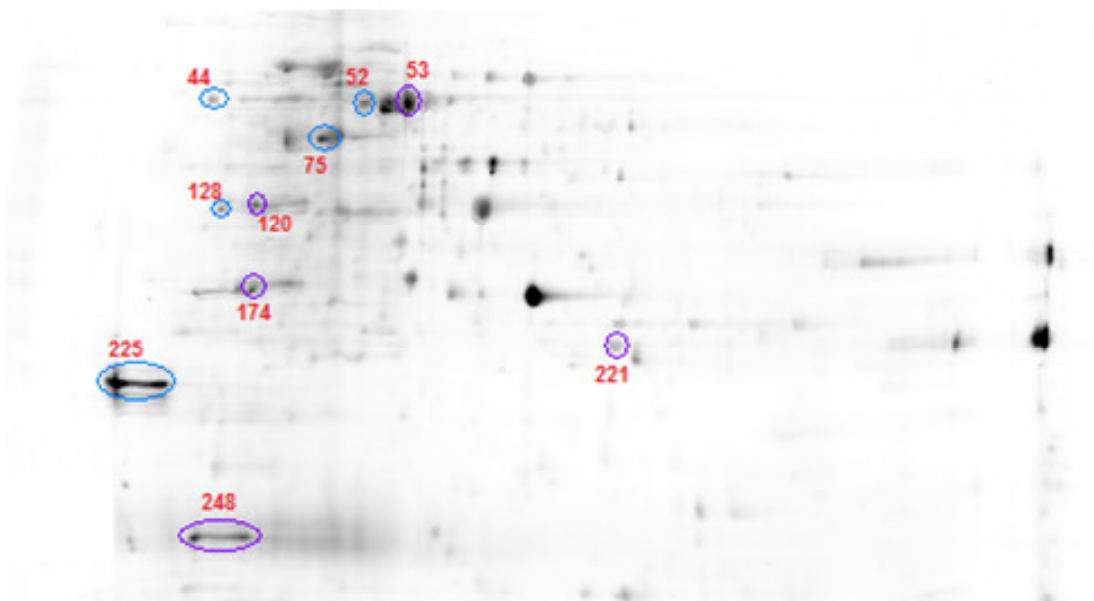


Figura 13: 2-DE dos spots protéicos com diferença de expressão significativa. Spots circulado pela cor azul referente a linhagem C231, roxo referente a linhagem 1002. A numeração está relacionada a identificação dos spots.

Tabela 6: Lista de proteínas extracelulares diferencialmente expressas identificadas por espectrometria de massa										
Spot	Proteína	Função	ID (NCBI) ^P		MW(kDa)	Sequência de peptídeos identificados	Protein score	Expressão		Fração celular
			1002	C231	P.I			1002	C231	
44	Chaperonin GroEL	Resposta a estresse térmico	ADL21673	ADL11255	57.12/4.72	K.SWGAPTITNDGVSIAR.E R.KVVVTKDETTIVEGAGSPEQIEGR.V	134	-1,85	+1,85	C
52	Trehalose corynomocolyl transferase C	Biosíntese da parede celular	ADL21812	ADL11400	70.34/5.61	R.TFPSVWALDGLR.A R.MTTQTFVDYAKR.A R.AYWSPATGAHALGGR.V K.NQGTYAGIGLEVISR.M K.FVGSFSGYLDTTSIGMPTAIR.A	248	-1,52	+1,52	S [#]
53	NlpC/P60	Hidrolise da parede celular	ADL21293	ADL10887	36.63/5.62	R.GAVIDPLTNAVSAENPQNAIDR.A	101	+2,21	-2,21	S
75	Putative secreted protein	Função desconhecida	ADL20097	ADL09691	51.41/5.43	K.HVDGAHLTPILSNSVK.A K.IQIVRPLNEGEKAEQLIK.Y	140	-1,55	+1,55	S [#]
120	Resuscitation-promoting factor RpfB	Reativação bacteriana	ADL20574	ADL10163	40.31/5.06	K.VQASQGWGAWPACTSK.L K.AGVTVGDKDIVYPGLTEK.I K.TVFTQIAAATVKDVLAEER.G	298	+1,64	-1,64	S
128	Putative secreted protein	Função desconhecida	ADL21714	ADL11301	40.90/5.05	R.EPLYHDLDFDR.L K.TANLLGVCTVGYVDTENNR.V K.NYFSQNSVAEPEVGDVLCAYGSR.T R.VWTDHCGNDGAEVYDEYQQTIGTLR. H	209	-1,78	+1,78	S
174	Putative secreted protein	Função desconhecida	ADL20770	ADL10365	30.07/5.19	K.SLYSLTVTR.E K.LVDPYTGNTVDFVR.G K.GKLVDPYTGNTVDFVR.G R.NFANDPINLIATSLEANR.M R.DQFGQAWSDDVEVEGGHNGCDTR.N	466	+1,68	1,68	S

211	Putative trypsin-like serine protease	Atividade proteolítica	ADL20653 ADL10245	25.72/6.49	R.AVEQIPHPTADIALIK.L R.HAVLIEQWISQGILR.Q R.HCLGAGPSTIGVGGQVFR.A K.TIAAGWGGIAHGAQWAEATTQR.R	404	+1,68 -1,68	S
225	Conserved hypothetical protein	Função desconhecida	ADL19922 ADL09511	19.86/4.30	K.VVDLDGKVTWAEAPFTVGE. K.TPEIDDRDDVLKYEPTTVK.A	126	-1,52 +1,52	S
247	Putative secreted protein	Função desconhecida	ADL21925 ADL11512	14.54/4.88	R.EVGPEGNSYIHSYGYK.F K.GEPFSPTGETELGTQTLTPSGR.V K.SADAINAWIKGEPFSPTGETELGTQTLTL PSGR.V	338	+1,91 -1,91	S

C = citoplasmático; M = membrana; PSE = potencialmente exposta a superfície celular; S = secretada

#Predição peptídeo sinal associado-Tat

\$Predita como lipoproteína

(P) Número de acesso as proteínas (projeto genoma no NCBI 40687 e 40875).

O ponto isoelétrico (p.I) e peso molecular (kDa) teórico foram calculados utilizando o programa ExPASy Tools.

As proteínas identificadas como diferencialmente expressas estão relacionadas a diversas funções (Tabela 6). No entanto há proteínas identificadas com funções desconhecidas, o que torna necessário a realização de estudos posteriores para avaliar suas possíveis funções.

A chaperonina bacteriana GroEL (*spot* 44, figura 13, tabela 6) pertence a subgrupos das chaperonas, uma das famílias de proteínas mais conservadas na natureza. Muitas são expressas em níveis significantes nas células eucarióticas e procarióticas em condições basais, e são essenciais para o crescimento celular em temperaturas fisiologicamente relevantes, em *E. coli* esta proteína é essencial para o crescimento em todas as temperaturas (FAYET; ZIEGELHOFFER; GEORGOPOULOS, 1989). A GroEL é a chaperonina mais caracterizada, em condições normais, 10 a 15% das cadeias de polipeptídeos que são sintetizadas interagem com GroEL, entretanto sob condições de estresse este número aumenta para 30% (QAMRA et al., 2005).

Klein et al. (2010) ao gerar linhagens de *Streptococcus mutans* com o nível de expressão de GroEL reduzido observou que as linhagens demonstraram crescimento lento a 43°C e redução da capacidade de formar biofilmes. Uma vez que *C. pseudotuberculosis* possui a capacidade de formar biofilmes e durante o curso de infecção há aumento de temperatura corporal do hospedeiro. A GroEL foi mais expressa na linhagem C231 em condições basais, isto pode sugerir que em um ambiente onde há estresse gerado pela elevação da temperatura a atuação da GroEL poderia ser mais efetiva na linhagem C231. Esta diferença de expressão também pode estar relacionado, à via de secreção, ou seja, pode sugerir que linhagem C231 utilizou uma via de secreção não clássica para exportar a GroEL uma vez que esta proteína é classificada como uma proteína citoplasmática. Torna-se necessário o uso de uma abordagem mais específica para validar esta diferença de expressão, como exemplo: a utilização de PCR em tempo real.

A *Trehalose corynomycetyl transferase* (*spot* 52, figura 13, tabela 6) é uma enzima da biosíntese dos componentes de ácidos corynomicólicos que desempenham papel na formação da parede celular de *Corynebacterium*. São constituídos por ácidos graxos com cadeias de alto peso molecular sendo os maiores constituintes da parede celular de *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium* (SHIMAKATA; MINTOGAWA, 2000; MENICHE et al., 2009). Estes

ácidos corynomicólicos podem atuar como fatores de virulência pois formam uma bicamada lipídica impermeável assimétrica que permite a sobrevivência da bactéria no ambiente hostil dos macrófagos (LIU, ROSENBERG; NIKAIDO, 1995; DUBNAU et al. 2000).

Alterações na quantidade e na estrutura dos ácidos micólicos podem afetar a permeabilidade, fluidez e outras características físicas da bicamada de membrana (WINDER, COLLINS, 1970). Um estudo realizado com linhagens mutantes de *Corynebacterium matruchotii* incapazes de sintetizar ácidos corynomicólicos, apresentaram mudanças drásticas na morfologia e crescimento pelo fato de que a parede celular formada era composta de ácidos graxos híbridos (TAKAYAMA et al. 2003). Os constituintes da parede celular de *C. pseudotuberculosis* inibem a ação de células fagocíticas, a *Trehalose corynomycolyl transferase* que é uma enzima que atua na produção destes constituintes. Esta proteína apresentou-se mais expressa na linhagem C231, ou seja, esta linhagem pode apresentar uma persistência maior no interior da célula e a linhagem 1002 pode ser mais vulnerável a ação das células fagocíticas. Embora a função exata das proteínas da parede e superfície celular não seja totalmente elucidado, é razoável esperar que as diferenças nos padrões de expressão destas proteínas entre as linhagens podem estar relacionados à diferenças na patogenicidade ou antigenicidade (DONALDSON et al., 2009).

A proteína NlpC/P60 (*spot* 53, figura 13, tabela 6) apresentou mais expressa na linhagem 1002. Esta proteína pertence a uma família de peptidases da parede celular, atuando em vários processos, tais como, modificação do peptidoglicano durante o crescimento, separação das células filhas durante a divisão celular, mobilidade, adesão e invasão bacteriana. Assim, pode contribuir diretamente para a patogenicidade bacteriana (KAJIMURA et al., 2005; HIRST, 2008; TRAN et al., 2010). Estudos demonstram essa proteína como alvo na produção de antimicrobianos devido a sua capacidade de agir na parede celular das bactérias, lisando *D*-glutamyl-meso-diaminopimelate ou *N*-acetylmuramate-L-alanine (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Seyffert et al. (2010b) ao analisar o imunoproteoma da *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002, detectou esta proteína demonstrando caráter imunogênico (SEYFFERT et al., 2010b). Além disso, um estudo classificou esta proteína como potencial biomarcador contra a infecção por *Bacillus anthracis* (SELA-ABRAMOVICH et al., 2009).

O *Resuscitation-promoting factor* RpfB (spot 120, figura 13, tabela 6) pertence à classe dos fatores de reativação bacteriana (Rpfs) em estado de latência. Estudos demonstram que esta proteína apresenta um sítio catalítico, semelhante ao da lisozima, que atua no peptídeoglicano da parede celular e um domínio G5 de cadeia longa que está presente em muitas proteínas de superfície celular, estando associado à adesão celular favorecendo a formação de biofilmes (RUGGIERO et al., 2008). Na caracterização do imunoproteoma da linhagem 1002, o ensaio por *Western blotting* revelou que esta proteína foi reativa contra o soro de animais infectados com *C. pseudotuberculosis*, sugerindo que possa ser um fator de virulência (SEYFFERT et al., 2010b). Esta proteína foi menos expressa na linhagem C231. Esta diferença de expressão pode influenciar em uma adesão celular e formação de biofilme mais bem sucedida na linhagem 1002, favorecendo o processo de infecção.

A *putative trypsin-like serine protease* (spot 120, figura 13, tabela 6) foi mais expressa na linhagem 1002. Esta proteína pertence ao grupo das *serino proteases* que são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo, denominado como tríade catalítica que desempenha um papel na formação de uma ligação transitória entre o substrato e a protease. Estudos demonstram que resíduos de serina estão atribuídos a fatores de virulência. Em *Staphylococcus aureus* estes resíduos estão associados às toxinas epidermolítica (REDPATH; FOSTER; BAILEY, 1991). Já em *Pseudomonas aeruginosa* as *serino proteases* degradam proteínas surfactantes dos pulmões do hospedeiro, resultando na redução da resposta imune e favorecendo a progressão da doença (MALLOY et al., 2005). Como possível fator de virulência, esta proteína menos expressa na linhagem C231, pode apresentar uma atividade reduzida durante o processo de infecção bacteriano.

A análise comparativa entre linhagens é uma abordagem bem interessante para avaliar o comportamento de bactérias, principalmente patogênicas, para obter uma melhor compreensão sobre fatores de virulência que atuam em mecanismos de patogenicidade (TROST et al., 2005; RYOO et al., 2007).

As duas linhagens utilizadas neste estudo foram isoladas de espécies diferentes de hospedeiros e países, sendo a *C. pseudotuberculosis* C231 isolada de ovino da Austrália e a *C. pseudotuberculosis* 1002 de caprino do Brasil. Estudos realizados com linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes

hospedeiros, avaliando o proteoma intracelular e extracelular demonstrou diferença de expressão em proteínas relacionadas a fatores de virulência e resposta a estresses, evidenciando que o fator hospedeiro pode influenciar na expressão de determinadas proteínas (DUMAS et al., 2008; DONALDSON et al., 2009). A questão de como as bactérias são capazes de se adaptar a hospedeiros específicos é um ponto central para compreender a origem das doenças infecciosas e o aparecimento de novos determinantes de virulência.

Durante o curso de infecção, *C. pseudotuberculosis* necessita adaptar-se rapidamente as diferentes condições ambientais encontradas durante o estágio inicial de infecção, partindo de um ambiente extracelular até a internalização celular, para isso torna-se necessário a expressão de várias proteínas de virulência que permitem a bactéria sobreviver a estas condições. As diferenças observadas na expressão das proteínas podem implicar no mecanismo de patogenicidade da LC, onde uma linhagem pode apresentar uma persistência maior ou susceptibilidade à ação do sistema imune do hospedeiro.

Quando bactérias são avaliadas em ambiente natural e no tecido infectado, biofilmes são as formas mais predominantes. Infecções que envolvem a formação de biofilmes são geralmente crônicas e mais difíceis de tratar. Estudos demonstram que *C. pseudotuberculosis* possui a capacidade de formar biofilme (OLSON et al., 2002). Rathsam et al. (2005) analisou a diferença de expressão de proteínas totais de *Streptococcus mutans* por 2D-DIGE na produção de biofilmes e demonstrou que proteínas relacionadas a biossíntese de nucleotídeos, maturação da parede celular e transporte de carboidratos foram reprimidas, podendo reduzir o grau de crescimento celular na maturação do biofilme, que pode tornar a bactéria mais susceptível a ação da resposta imune produzida pelo hospedeiro.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que esta diferença de expressão pode influenciar no comportamento bacteriano durante o processo de infecção repercutindo de uma forma direta no mecanismo de patogenicidade. Uma vez que a ação destas proteínas ocorre de maneira sistemática para desencadear este mecanismo, a caracterização das proteínas sem funções estabelecidas são importantes para avaliar se desempenham papel relevante na fisiologia ou na virulência destes organismos. Catalogar essas diferenças de expressão em nível de

proteína é uma etapa essencial para a compreensão sobre a ação destas neste contexto.

5.2.5 Conclusões da parte II

- ✓ Foi demonstrado pela primeira vez um estudo comparativo entre linhagens de *C. pseudotuberculosis*, sob condições normais, utilizando a técnica de 2D-DIGE.
- ✓ Com a utilização da 2D-DIGE foi possível detectar e identificar proteínas expressas diferencialmente entre as *C. pseudotuberculosis* 1002 e *C. pseudotuberculosis* C231, relacionadas a fatores de virulência, processos biológicos e funções desconhecidas.
- ✓ Esta regulação diferencial de expressão pode ter um impacto sobre o comportamento clínico e a adaptação de cada linhagem em relação a um determinado hospedeiro.
- ✓ A utilização de outras abordagens como PCR em tempo real para validar estes resultados e a geração de linhagens mutantes para complementar esses resultados obtidos, são importantes para determinar o verdadeiro nível funcional destas proteínas no sistema biológico em estudo.

5.3 PARTE III: Caracterização do exoproteoma de *C. pseudotuberculosis* utilizando eletroforese bidimensional (2-DE).

5.3.1 Eletroforese bidimensional

Após avaliar a diferença de expressão das proteínas extracelulares entre as diferentes linhagens, o próximo passo deste trabalho foi caracterizar as proteínas extracelulares das linhagens 1002 e C231 de *C. pseudotuberculosis*. Para isso, as proteínas foram extraídas no fase exponencial tardia, ou seja, ponto entre o meio e o fim da fase exponencial. Foram aplicados 230µg do extrato proteico de cada amostra em tiras de 18 cm com intervalo de pH 3-10 N.L. Os géis foram corados por Coomassie Blue G250.

Após a 2-DE os géis foram digitalizados no *ImageScanner* (GE Healthcare), a análise das imagens foram feitas pelo programa *ImageMaster 2D Platinum 7*. Os géis foram alinhados a partir de *spots* que apresentaram reprodutibilidade e foram detectados pelo programa automaticamente, seguido de uma análise manual para eliminar possíveis artefatos nas imagens. As réplicas biológicas foram comparadas através da igualdade dos *spots* em conjunto ou individualmente entre todos os géis. Baseado nestes parâmetros foi possível detectar 85 *spots* na *C. pseudotuberculosis* 1002 e 80 *spots* na *C. pseudotuberculosis* C231.

5.3.2 Identificação dos *spots* protéicos por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) e busca em banco de dados

Após obter o resultado das imagens dos géis, os *spots* foram excisados dos mesmos, submetidos à digestão triptica e analisados por MALDI-TOF MS/MS. A análise dos *spots*, combinada à busca em bancos de dados utilizando o *software* MASCOT, permitiu a identificação de 55 proteínas na linhagem 1002 e 45 na linhagem C231. As proteínas foram identificadas a partir do sequenciamento dos peptídeos tripticos, somente 6 proteínas, obtiveram apenas a sequência de um peptídeo identificada, as demais proteínas obtiveram mais de duas sequências

identificadas e a que teve o maior número de peptídeos triptícos identificados foi a proteína *trehalose corynomycolyl transferase*, que apresentou 10 sequências de peptídeos, demonstrando uma boa cobertura na identificação das proteínas (Tabela 7).

A partir desta abordagem foi possível caracterizar 60 proteínas de *C. pseudotuberculosis* (Figura 14), foram identificadas 40 proteínas comuns em ambas as bactérias (Tabela 7), dentre as proteínas identificadas como exclusivas foi possível distinguir 15 proteínas da linhagem 1002 (Tabela 8) e 5 proteínas na linhagem C231 (Tabela 9). Os mapas protéicos podem ser visualizados nas figuras 16 e 17.

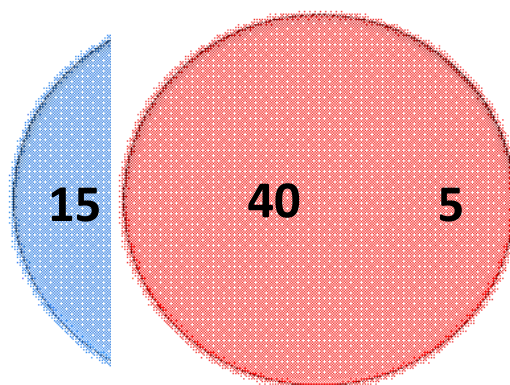


Figura 14: Distribuição das 60 proteínas de *C. pseudotuberculosis* identificadas. Azul = proteínas exclusivas da linhagem 1002; Interseção = proteínas comuns entre as linhagens; vermelho = proteínas exclusivas da linhagem C231.

Alguns *spots* protéicos foram identificados como uma mesma proteína, demonstrando a presença de isoformas (*spots* 2,3; 8,9; 13,16; 14,15,19,23; 20,61). Este evento está relacionado a modificações pós-traducionais, processo bem caracterizado em eucariotos, por outro lado, em procariotos há pouco conhecimento sobre o seu papel na fisiologia bacteriana (ROSEN et al., 2004). Os principais tipos de modificações pós-traducionais que podem ocorrer são: fosforilação, hidrólise, acetilação, desaminação, alquilação, oxidação da cisteína ou nitração da tirosina (HALLIGAN et al., 2004).

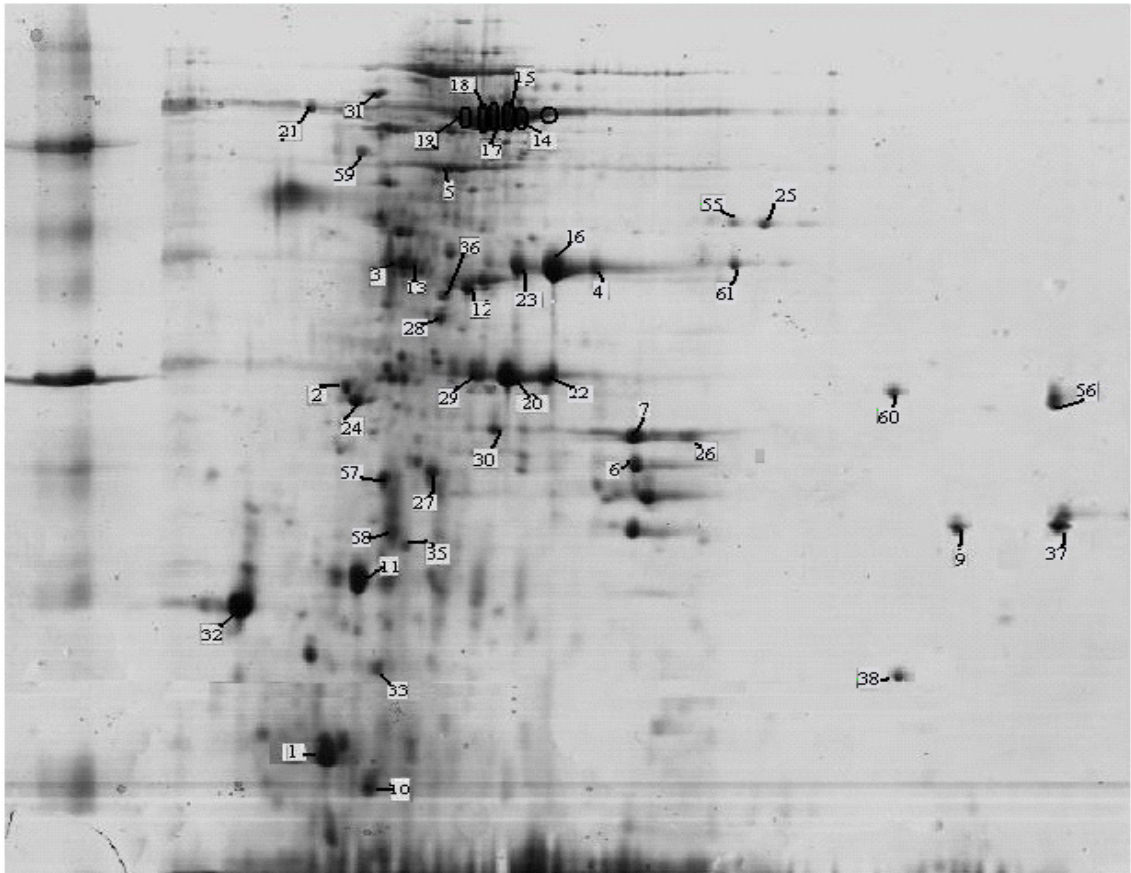


Figura 15: 2-DE das proteínas extracelulares da linhagem C231 corado com *Coomassie coloidal*. Perfil eletroforético utilizando tira de 3-10 N.L. A numeração de 1-38; 55 e 61 indicam proteínas comuns entre as linhagens. Numeração 56-60 proteínas tidas como exclusivas.

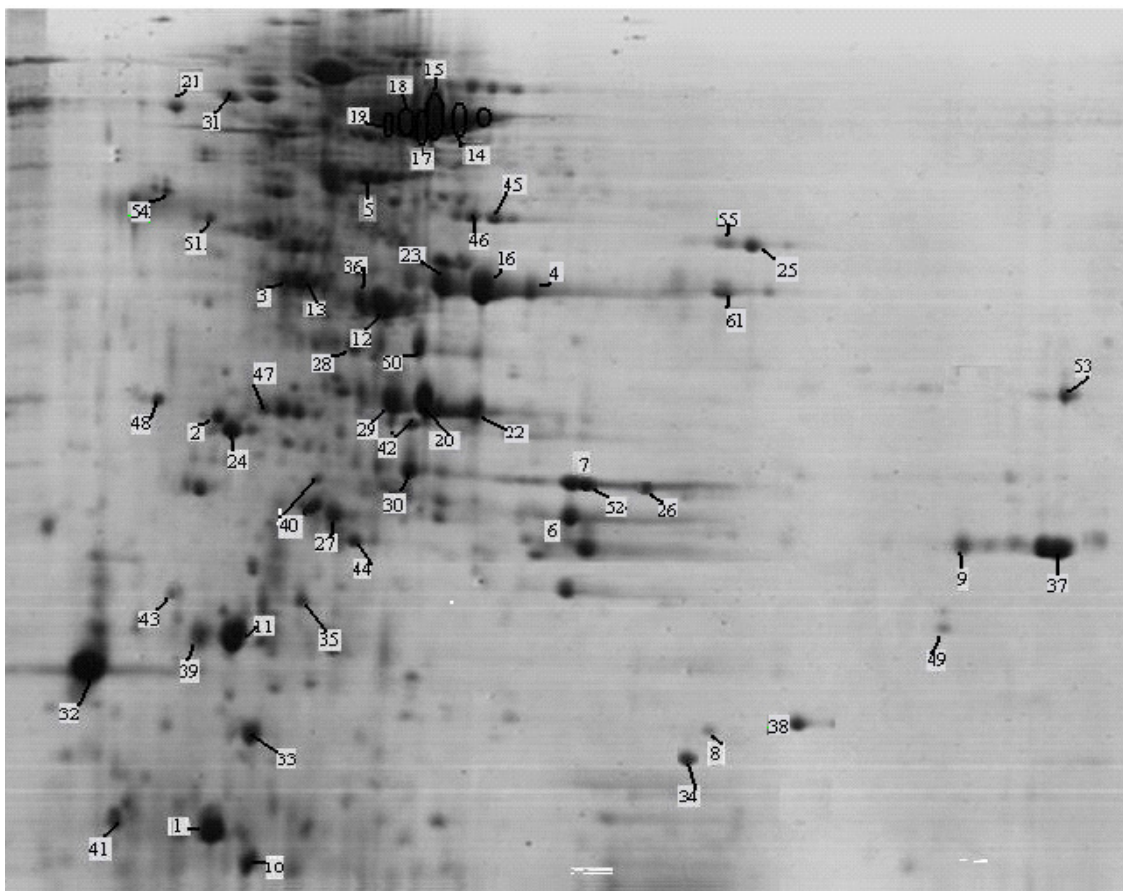


Figura 16: 2-DE das proteínas extracelulares da linhagem 1002 corado com *Coomassie*. Perfil eletroforético utilizando tira de 3-10 N.L. A numeração de 1-38; 55 e 61 indicam proteínas comuns entre as linhagens. Numeração 39 -54 proteínas tidas como exclusivas.

O critério adotado para classificar uma proteína como exclusiva foi a presença ou ausência do *spot* nos géis de cada linhagem. Deve-se considerar que o processamento destas proteínas em determinada linhagem pode estar relacionada à condição determinada de crescimento ou uma vez que estas bactérias foram isoladas de países e hospedeiros diferentes o que poderia influenciar na produção de determinadas proteínas. No experimento anterior utilizando 2D-DIGE, pôde-se observar que ocorre diferença de expressão entre as proteínas extracelulares das duas linhagens.

As 15 proteínas presentes somente nos géis da linhagem 1002 (Tabela 8) estão relacionadas a diversos processos como resposta a estresse térmico e oxidativo, produção de energia, mecanismo de transporte e há presença de proteínas sem função estabelecida. As *ORFs* (*open reading frame*) que codificam

estas proteínas foram visualizadas no genoma da linhagem C231. Entretanto foi observado que a *ORF* que codifica *putative DsbG protein*, estava presente somente no genoma da linhagem 1002, demonstrando que a proteína codificada é exclusiva da *C. pseudotuberculosis* 1002. A *putative DsbG protein* (*spot* 43, tabela 8 e figura 16) foi bem caracterizada em *E. coli* e pertence a superfamília das *thioredoxin*, esta proteína contém uma sequência Cys-x-x-cys que é característico das Dbs. Sua função é atuar como uma chaperona na formação de pontes de dissulfeto em proteínas secretadas. No entanto, estudos indicam que a DsbG esta relacionada como redutor ou catalisador para a isomeração dissulfeto (BESSETTE et al.,1999).

Na linhagem C231 foram identificadas 5 proteínas como exclusivas (Tabela 9), que estão relacionadas a virulência (PLD e CP40) e que serão discutidas no item 5.3.3, duas proteínas sem funções estabelecidas (*putative protein secreted*) e uma *putative esterase lipase*. As *ORFs* que codificam estas proteínas foram visualizadas no genoma da linhagem 1002.

Tabela 7: Lista de proteínas extracelulares comuns entre as linhagens de *C. pseudotuberculosis*

Spot	Proteína	ID (NCBI) ^P <u>1002</u> <u>C231</u>	MW(kDa)/P.I	Sequência de peptídeos identificados	Protein Score	Predição SurfG
1	Putative secreted protein	ADL21925 ADL11512	14.54/4.88	R.EVGPEGNSYIHSYFYK.F K.GEPFSPTGETELGTQTLTLPSGR.V R.EVGPEGNSYIHSYGYKFGYGTQK.S	334	S
2	Putative secreted protein	ADL21714 ADL11301	40.90/5.05	R.LSDTTEMQWSVNNR.A K.TANLLGVCTVGYVDTENNR.V R.NPLNLRPLPYHDFDR.L	190	S
3	Putative secreted protein	ADL21714 ADL11301	40.90/5.05	R.EPLYHDLDFDR.L K.TANLLGVCTVGYVDTENNR.V K.NYFSQNSVAEPEVGDVLCAYGSR.T R.VWTDACHCGNDGAEVYDEYQQTIGTLR.H	209	S
4	Cytochrome c oxidase subunit 2	ADL21302 ADL10895	40.33/6.03	K.VTVDVTAYQWNWK.F K.SIGEOPYATTHPFNSER.A	155	PSE
5	Putative secreted protein	ADL20097 ADL09691	51.41/5.43	R.ISEGLTVTMLDDDFGR.G K.DGKEFAIIFGDSFTGER.L K.GLDKFFNITPKPADAQPTPR.A	241	S [#]
6	Putative trypsin-like serine protease	ADL20653 ADL10245	25.72/6.49	R.AVEQIPHPTADIALIK.L R.HAVLIEQWISQGILR.Q	167	S
7	Putative secreted protein	ADL20288 ADL09881	26.80/9.07	K.QSVDNAVNFAPGLIQR.T R.SWLQNNQVSYGAVPISSGR.V R.TAPPVVPAAPAPVPVTPPAFDTGSCPAFAR.A	273	S [#]
8	Hypothetical protein	ADL09626 ADL09626	24.30/9.24	K.VAGWNATSQADR.V K.AITLDTTLEYTYTVGVR.A K.IHSQGGYTEFSELTEFVPSVGR.L	228	S
9	Hypothetical protein	ADL09626 ADL09626	24.30/9.24	K.VAGWNATSQADR.V K.AITLDTTLEYTYTVGVR.A K.IHSQGGYTEFSELTEFVPSVGR.L	309	S
10	Hypothetical protein	ADL21703 ADL11290	87.79/5.09	K.FLTPLFGESFESVK.K	138	S

					K.FLTPLFGESFESVKK.V		
11	Resuscitation-promoting factor A	ADL20487	ADL10080	21.52/6.07	K.GFGGGQYAPTADK.A K.GFGGGQYAPTADKATR.E K.VLASQGWGAWPSCSAK.L	218	S
12	Putative lysozyme precursor	ADL19973	ADL09563	40.28/5.58	K.TPQELVNWTR.D K.FASINLPELADLGK.N K.VGSYHYARPGADAR.Q R.ADELNIDANQVAQVLR.S K.ATEGLGWTNDFYASDITQAAAQGLK.V R.HYANVISHTPNHSLPPVLDEVAEGK.T	491	S [#]
13	Surface layer protein A	ADL20140	ADL09734	38.67/5.90	R.LQSLNIPADFNL.R R.NTGTHSWSYWQDDL.R.A R.LQSLNIPADFNL.R R.NTGTHSWSYWQDDL.R.A K.ASSPDRPTVYLLNGGDGGEGR.A R.GTEVYVSNASGVAGGHDILANPR.F K.TPAQISNGTALADVHFATPDISPVWR.E	496	S
14	Trehalose corynomycolyl transferase C	ADL21812	ADL11400	70.34/5.61	R.GNIYWSPER.G R.TFPSVWALDGLR.A K.LKDNVVAQFER.G R.MTTQTFVDYAKR.A R.AYWSPATGAHALGGR.V K.NQGTAYAGIGLEVISR.M R.AVVGLSMGGTAAVNLAER.R K.SAAMPGNPIQVQVLLAR.D K.GGQVGTCVNNEYDIAGGKAEDFVDGR.A	719	S [#]
15	Trehalose corynomycolyl transferase C	ADL21812	ADL11400	70.34/5.61	R.GNIYWSPER.G R.TFPSVWALDGLR.A K.LKDNVVAQFER.G R.AYWSPATGHALGGR.V	800	S [#]

					K.NQGTYAGIGLEVISR.M R.AVVGLSMGGTAAVNLAER.R K.SAAPGNPIQVQVLLAR.D K.TYVSAGSGRDDYQPGSVAK.N K.FGSFSGYLDTTSIGMPTAIR.A K.GGQVGTVCVNNEIAGGKAEDFVDGR.A		
16	Surface layer protein A	ADL20140	ADL09734	38.67/5.90	R.LQSLNIPADFNLN.N R.NTGTHSWSYWQDDL.R.A R.GTEVYVSNASGVAGGHILANPR.F	175	S
17	NLP/P60 protein	ADL21293	ADL10887	36.63/5.62	R.GAVIDPLTNAVSAENPQNAIDR.A	101	S
18	Putative protein secreted	ADL10547	ADL10547	63.17/5.59	K.ALVDYHDAQSSAQQAR.D K.ATAQQAIDDSSAKLEDNIR.K R.AYIGTPYAWGGGNASGPTLGIR.D	217	S
19	Trehalose corynomocolyl transferase C	ADL21812	ADL11400	70.34/5.61	R.GNIYWSPER.G R.TFPSVWALDGLR.A K.LKDNVVAQAQFER.G R.AYWSPATGAHALGGR.V K.NQGTYAGIGLEVISR.M R.AVVGLSMGGTAAVNLAER.R	417	S [#]
20	Corynomocolyl transferase	ADL21610	ADL11196	41.80/7.05	K.GGVHDWPLFN.R.Q K.AAHVAQSIGFPGWR.L K.GVFGISGCYATQEPVGR.I	123	S ^{\$}
21	GroEL chaperonin	ADL21673	ADL11255	57.12/4.72	K.SWGAPTITNDGVSIAR.E R.KVVVTKDETTIVEGAGSPEQIEGR.V	134	C
22	Trehalose corynomocolyl transferase B	ADL21814	ADL11402	36.67/6.90	R.GGNAALYLLDGR.A R.RIELDPLFNMR.G R.RIELDPLFNMR.G K.WETFLTQELPAYLEAHFGVAR.N R.DWLRPDATGTCEWDAANYWVQR.C	245	S

23	Trehalose corynomycolyl transferase C	ADL21812	ADL11400	70.34/5.61	R.GNIYWSPER.G R.TFPSVWALDGLR.A K.LKDNVVAQAQFER.G R.MTTQTFVDYAKR.A R.AYWSPATGAHALGGR.V K.NQGTYAGIGLEVISR.M K.SAAMPGNPIQVQVLLAR.D K.TYVSAGSGRDDYQPGSVAK.N K.GGQVGTCVNNEYDIAGGKAEDFVDGR.A	685	S [#]
24	Putative secreted protein	ADL20770	ADL10365	30.07/5.19	K.SLYSLTVTTR.E K.LVDPYTGNTVDFVR.G K.GKLVDPYTGNTVDFVR.G R.NFANDPINLIATSLEANR.M R.DQFGQAWSDDVEVEGGHNGCDTR.N	466	S
25	Putative secreted hydrolase	ADL20134	ADL09728	29.04/8.83	R.IQIVGYPTIVTGSRI R.VVITHGFNDTYFNGGESEGATR.A	91	S
26	Putative secreted protein	ADL20288	ADL09881	26.80/9.07	K.QSVDNAVNFAPGLIQR.T R.SWLQNNQVSYGAVPISSGR.V R.TAPPVVPAPAPVPPTPPAFDTGSCPAFAR.A	265	S [#]
27	Resuscitation-promoting factor RpfB	ADL20574	ADL10163	40.31/5.06	K.VQASQGWGAWPACTSK.L K.AGVTVGDKDIVYPLTEK.I K.TVFTQIAAATVKDVLAEER.G	298	S
28	Putative cytochrome c oxidase subunit 2	ADL21302	ADL10895	40.33/6.03	K.VTVDVTAYQWNWK.F R.DVYNHPEQNKQQR.R K.FGYSDIAADLSPTGAEYK.G K.FGYSDIAADLSPTGAEYKGVDDAR.Q	390	PSE
29	Putative trypsin-like serine protease	ADL20653	ADL10245	25.72/6.49	R.AVEQIPHPTADIALIK.L R.HAVLIEQWISQGILR.Q R.HCLGAGPSTIGVGGQVFR.A K.TIAAGWGGIAHGAQWAEATTQR.R	404	S

30	Chaperone protein DnaK	ADL21757	ADL11343	65.61/4.68	K.LLGSFELGGIAPAR.G R.DAESYLGDEVTDVAVITVPA YFSDAQR.Q	118	
31	Sialidase precursor	ADL21757	ADL11343	74.86/5.05	R.VLLYSAPIDTR.I R.SNGWVMASCDDGR.S K.SAAQDAIAAAEEANAR.V R.IPAIATAVDGTLVAFDNR.Y K.AGGTDNTENKGFWQELLR.I	415	S
32	Conserved hypothetical protein	ADL19922	ADL09511	19.86/4.30	K.VSVSASPDAKPGDYYTVK.V K.VVDLDGKVTWAEAPFTVGE.-	145	S
33	Hypothetical protein	ADL21702	ADL11289	10.89/5.16	K.TIEQPGSNWINWFYETSK.H	90	S
34	Hypothetical protein	ADL21704	ADL11291	8.97/5.82	K.NLATINDFIAR.G K.SVFFHFHQLTTGSSAPATAPAEK.A	90	
35	Elongation factor P	ADL21021	ADL10611	20.57/5.24	K.NYEQVELAPHILGDAAR.F	108	S
36	Trypsin-like serine protease	ADL20555	ADL10144	48.98/5.29	K.QIGINSVIASLSQR.Q K.ATQPMIGIQLVSNAR.V R.QSQSGAQAGSIGLGFAIPSNFAR.R	93	S
37	Putative serine protease	ADL20429	ADL10025	31.47/9.59	R.SVSLQIDQAAAQR.T R.RSVSLQIDQAAAQR.T	108	S
38	Putative secreted metalloendopeptidase	ADL20536	ADL10125	24.83/7.23	K.IVVHTPAMGTLTSPYGMW	64	PSE
55	Putative secreted protein	ADL20466	ADL10062	41.34/8.52	K.AFEPIDGPNYHWR.T R.VAGSWFNPDVPAESLAAEKR.G	99	S [#]
61	Corynomycolyl transferase	ADL21610	ADL11196	41.80/7.05	K.GGVHDWPLFNR.Q K.AAHVAQSIGFPGWR.L K.GVFGISGCYATQEPVGR.I	123	S ^{\$}

C = citoplasmático; M = membrana; PSE = potencialmente exposta à superfície celular; S = secretada

(#) Predição peptídeo sinal associado-Tat

(\$) Predita como lipoproteína

(P) Número de acesso as proteínas (projeto genoma no NCBI 40687 e 40875).

O ponto isoelétrico (p.I) e peso molecular (kDa) teórico foram calculados utilizando o programa *ExPASy Tools*.

Tabela 8: Lista de proteínas extracelulares exclusivas da *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002

Spot	Proteína	ID (NCBI) ^P	MW (kDa)/P.I	Sequência de peptídeos identificados	Mascot score	Fração celular
39	Thiol peroxidase	ADL21047	15.85/4.56	R.FCAAEGLDNVIPASAFR.S R.IVFNIFPSVDTDCAASVR.R	120	C
40	Manganese superoxide dismutase	ADL21849	22.08/5.07	K.AVWNVFNWEDVAAR.Y	109	C
41	Co-chaperonin GroES	ADL20318	10.60/4.49	K.YNGEEYLLLNR.D K.YGGTELKYNEEYLLLNR.D	219	C
42	Carbonate dehydratase	ADL20477	26.17/6.24	K.KLPATHDWLTR.S R.IDAETLLSAKPGELFHLR.N R.ANAAAQLENLMSHPFVSDR.V	155	S
43	Putative DsbG protein	ADL21555	26.67/5.43	K.WSNEDFANAAK.N R.TLLMEEQNSIYGK.W K.KIDLIEDYSCSHCAELGK.A	198	C
44	Elongation factor Tu	ADL20240	44.14/4.83	K.STQTTVTGIEMFR.K R.HYAHVDAPGHADYIK.N K.LLDYTEAGDNCGLLLR.G R.GITINISHVEYQTEKR.H R.KLLDYTEAGDNCGLLLR.G R.GQVVVKPGAYTPHTEFEGSVYVLSK.D K.VLADAYPDLNEAFAFDAIDKAPEEKER.G	466	C
45	Surface layer protein A	ADL20140	38.67/5.90	R.LQSLNIPADFNLR.N R.NTGTHSWSYWQDDL.R.A K.FSYYTDWVSNAALGGK.Q K.ASSPDERPTVYLLNGGDGGEGR.A R.GTEVYVSNASGVAGGHIDILANPR.F K.TPAQISNGTALADVHFGATPDISPVWR.E	526	S
46	Resuscitation-promoting factor RpfB	ADL20574	40.31/5.06	K.VQASQGWGAWPACTSK.L	197	S

				K.TVFTQIAAATVKDVLAEER.G		
47	Phosphoglycerate kinase	ADL20990	44.11/4.61	R.SDFNVPLNDARE.E K.RLPHYAGALVEK.E K.TLKDLIAEGVEGR.H K.SLLQEDQIANCQR.L R.ANGLNDGVLLENV.R.F K.AVESPERYVVVLGGAK.V	391	C
48	ABC-type transporter	ADL20391	46.01/4.80	K.SLENAAPRVSPFYPAISK.A K.ATVESATYNGTLYALPQNTNGQLLFR.N	175	S ^{\$}
49	Putative cytochrome c oxidase subunit 2	ADL21302	40.33/6.03	K.VTVDVTAYQWNWK.F K.FGYSDIAADLSPTGAEYK.G	216	PSE
50	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDHAH)	ADL20991	36.37/5.35	R.VPVITGSATDLTFYASK.E R.LGKDVTYDDESITVDGHR.I R.GADVEVVAINDLTDNHTLSHLLK.Y	362	C
51	Enolase	ADL20605	45.17/4.68	K.AAAESAGLPLYR.Y K.VQIVGDDFFVTNPVR.L K.VNQIGTLTETFDVLAHR.N	271	S
52	Putative secreted protein	ADL20288	26.80/9.07	K.QSVDNAVNFAPGLIQR.T R.SWLQNNQVSYGAVPISSGR.V R.TAPPVVPAPAPVPTPPAFDTGSCPAFAR.A	431	S [#]
53	Putative twin-arginine translocation pathway signal protein	ADL20508	31.62/9.52	K.GRPIYVAIDNPTR.A R.LGSFFWQHDWGSNGR.I	66	S [#]
54	Putative exported lipase	ADL21667	44.17/5.03	R.EPIHNLNTR.G R.LTSLISDDVFQR.A R.GPGPRPVALLAPGTQGAGDSCAPSK.L	116	S

C = citoplasmático; M = membrana; PSE = potencialmente exposta a superfície celular; S = secretada

(#) Predição peptídeo sinal associado-Tat

(\$) Predita como lipoproteína

(P) Número de acesso as proteínas (projeto genoma no NCBI 40687).

O ponto isoelétrico (p.I) e peso molecular (kDa) teórico foram calculados utilizando o programa ExpASY Tools.

Tabela 9: Lista de proteínas extracelulares exclusivas da <i>C. pseudotuberculosis</i> linhagem C231						
Spot	Proteína	ID (NCBI) ^P	MW (kDa)/P.I	Sequência de peptídeos identificados	Mascot Score	Fração celular
56	Phospholipase D precursor	ADL0952 4	34.09/8.91	K.TFGWTIATGQDAR.V R.DGEAVALSGPAQDVLNDFAR.S K.IADYGYYNINQGFGNCYGTWNR.T	286	S
57	Serine proteinase precursor (CP40)	ADL1133 9	43.04/6.48	K.ESVTQVWNGFR.D K.GGTFAVALDRDGR.T	65	S
58	Putative secreted protein	ADL1024 8	24.39/5.34	K.DFADTLPEPLR.N K.AKDFATLPEPLR.N K.EGETAFVFTALGTGK.L	169	S ^{\$}
59	Putative secreted protein	ADL0969 1	51.31/5.35	K.HVDGAHLTPILSNSVK.A R.ISEGLTVTMLDDLFR.G K.FFNITPKPADAQPTPR.A K.IQIVRPLNEGEKAEQLIK.Y	143	S [#]
60	Putative esterase/lipase	ADL1119 6	41.80/7.05	K.GGVHDWPLFNR.Q K.GVFGISGCYATQEPVGR.I	79	S ^{\$}

C = citoplasmático; M = membrana; PSE = potencialmente exposta à superfície celular; S = secretada
 (#) Predição peptídeo sinal associado-Tat
 (\$) Predita como lipoproteína
 (P) Número de acesso as proteínas (projeto genoma no NCBI 40875).
 O ponto isoelétrico (p.I) e peso molecular (kDa) teórico foram calculados utilizando o programa *ExPASy Tools*.

As proteínas comuns detectadas em ambas as linhagens foram classificadas de acordo com o segundo nível do programa Blast2GO (www.blast2GO.org) que possibilitou classificar as proteínas em níveis de processos biológicos (Figura 17). As categorias mais expressivas estão vinculadas a processos metabólicos, sendo este resultado bastante comum em estudos relacionados à caracterização proteômica de microrganismos procariotos (extracelular, superfície, proteoma do lisado total) (HANSMEIR et al., 2006; 2007). Estes resultados corroboram com os dados do genoma das duas linhagens, nos quais a maioria dos genes estão relacionados a codificação de proteínas associadas a processo metabólicos.

Foram identificadas 15 proteínas comuns em ambas as linhagens com funções desconhecidas. Entretanto foi identificada uma *hypothetical protein* (*spot 8 e 9*, tabela 7, figura 15 e 17) que após a busca em banco de dados, não apresentou similaridade com outras *Corynebacterium*, nem com outros gêneros bacterianos. Este resultado sugere que esta proteína seja exclusiva de *C. pseudotuberculosis* demonstrando a necessidade de estudos específicos como geração de linhagens mutantes para tentar avaliar se esta proteína tem papel relevante na patogênese e virulência deste microrganismo.

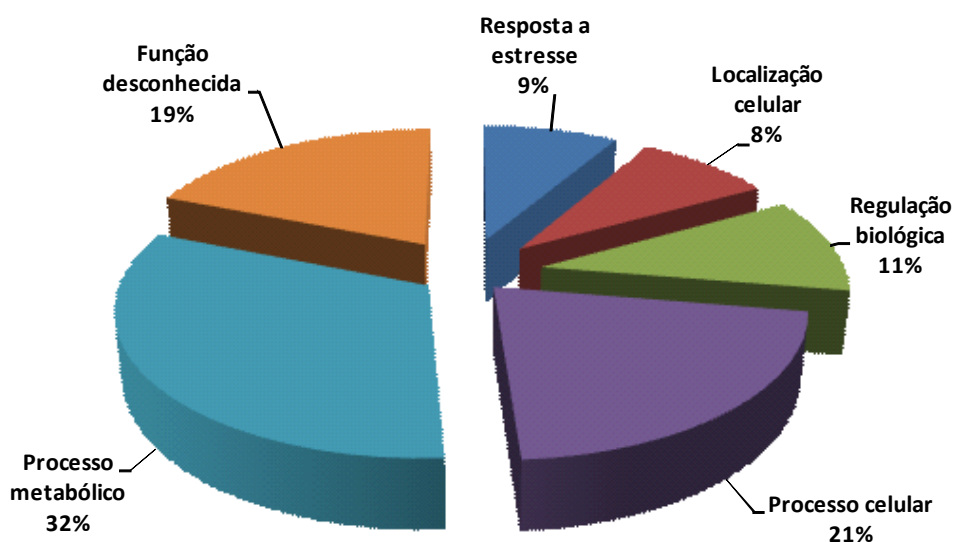


Figura 17: Classificação das proteínas extracelulares comuns com funções estabelecidas das linhagens 1002 e C231 em níveis de processos biológicos. As proteínas foram identificadas por espectrometria de massa e as análises feitas utilizando-se o programa *Gene Ontology*.

5.3.3 Proteínas identificadas relacionadas à virulência e resposta imunológica

O presente trabalho utilizou 2-DE associado a espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) e detectou proteínas relacionadas a fatores de virulência como a fosfolipase D, serino proteinases (CP40), *metalloendopeptidases*, *surface layer A*, NLp60 e proteínas da família de fatores de reativação bacteriana em estado de latência (SONGER et al., 1997; HETT et al., 2007; KIKKAWA; HITOMI; WATANABE, 2007; SELA-ABRAMOVICH, et al., 2009).

C. pseudotuberculosis tem como seu principal fator de virulência a exotoxina PLD que favorece a disseminação deste patógeno no organismo do hospedeiro (SONGER, 1997). Estudos realizados através da geração de linhagens mutantes para PLD demonstraram que estas linhagens apresentavam nível de infecção reduzido, demonstrando sua importância na virulência deste patógeno (HODGSON et al., 1992).

Outra proteína considerada fator de virulência de *C. pseudotuberculosis* é a *serine proteinase* (CP40) que possui atividade proteolítica (WILSON; BRANDON; WALKER, 1995). Após ser clonada e expressada em *E. coli*, ensaios imunológicos foram realizados e esta proteína demonstrou atividade protetora em animais infectados com *C. pseudotuberculosis*. No entanto esta proteína está presente somente em *C. pseudotuberculosis* estando ausente em outras bactérias patogênicas e não patogênicas do gênero *Corynebacterium*, sendo por tanto proteína exclusiva desta espécie e potencial alvo na produção de vacinas ou métodos de diagnóstico (WILSON; BRANDON; WALKER, 1995; PACHECO et al., 2011).

Nesta abordagem utilizando o sistema dependente de gel, não foi possível detectar a presença da PLD (*spot* 56, tabela 9 e figura 15) e CP40 (*spot* 57, tabela 9 e figura 15) no mapa protéico gerado para a *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002, sendo o mesmo resultado obtido anteriormente em um estudo realizado em um sistema livre de gel (TPP/LCMS^E) (PACHECO et al. 2011).

O fato da ausência da expressão de PLD e CP40 nos géis da *C. pseudotuberculosis* 1002 pode estar relacionado à atenuação da linhagem bacteriana ou pelo fato da bactéria só expressar estas proteínas durante seu processo de infecção. Um estudo baseado na análise da expressão gênica do gene

pld demonstrou que sua expressão está relacionada a múltiplos fatores como: dependência de densidade celular, regulação por choque térmico e expressão em culturas de macrófagos (MCKEAN; DAVIES; MOORE et al., 2007).

Seyffert et al. (2010b) ao analisar o imunoproteoma da *C. pseudotuberculosis* 1002 identificou 6 proteínas de caráter imunogênico. No presente trabalho foi possível identificar 4 destas 6 proteínas presentes no géis das duas linhagens bacterianas: *surface layer A*, NLPc/P60, *metalloendopeptidase*, *resuscitation-promoting factor RpfB*.

A *Resuscitation-promoting factor A* (spot 11, tabela 7 e figura 15 e 17) e *Resuscitation-promoting factor B* (spot 27, tabela 7 e figura 16 e 18) pertencem a família dos fatores promotores de reativação (Rpf), que são proteínas extracelulares presentes nas actinobactérias. Essas proteínas atuam na ativação do crescimento bacteriano em situações nas quais há escassez de nutrientes (RAVAGNANI, et al., 2005). Em *Mycobacterium tuberculosis*, foi demonstrado que a interação entre Rpf e a *D,I*-endopeptidase e, deste complexo, com a proteína de interação RpfA (Ripa), permitiu que essas proteínas degradassem o peptídeoglicano sinergicamente para facilitar o crescimento bacteriano. Além disso, a ação combinada de Rpf com Ripa e outras hidrolases de peptídeoglicano poderia produzir muropeptídeos, gerando diversos efeitos biológicos relacionados à sinalização bacteriana, podendo estar associados à adesão celular e na formação de biofilmes (KANA, MIZRAHI, 2009).

As proteínas *surface layer (S-layers)* (spots 13 e 16, tabela 7, figura 15 e 17) são compostas por subunidades únicas de proteínas ou glicoproteínas que abrangem o envelope exterior da célula. Estas proteínas representam cerca de 10% a 15% do total de proteínas de uma célula bacteriana. Em bactérias Gram-positivas e Arqueas as subunidades *S-layer* são associadas à camada de peptídeoglicano contendo ou não pseudomureína. Em Gram-negativas a *S-layer* está associada à membrana externa e aos lipopolissacarídeos (LPS) (SARA; SLEYTER, 2000). As *S-layer* possuem suas funções atribuídas à proteção celular como uma forma de “escudo protetor”, captação de moléculas ou íons, fatores de virulência relacionado à adesão celular e resistência contra a ação de leucócitos polimorfonucleares na ausência de opsoninas. Estudos demonstraram a utilidade destas proteínas em bioprocessos, como as *S-layers* de *Lactobacillus* que possuem papel importante na

entrega de antígenos, imunoterapia de câncer e antialérgicos (AVALL-JAASKELAINEN; PALVA, 2005; JAHN-SCHIMD, et al., 2006).

As metaloproteinases (*spots* 38, tabela 7 e figura 15 e 17) fazem parte de uma família de enzimas proteolíticas. Essas proteínas são amplamente encontradas em bactérias patogênicas e podem atuar como fatores de virulência porque clivam ligações internas de peptídeos. Estudos demonstram que linhagens patogênicas de *Helicobacter pylori* promovem uma indução seletiva de metaloproteases *in vitro* e na mucosa gástrica durante o câncer gástrico (CRAWFORD et al., 2003). Em *B. subtilis* as metaloproteases possuem atividade similar a das termolisinas (LEVY et al., 1975). *Streptococcus sanguis*, importante patógeno em casos de endocardite, produz uma imunoglobulina extracelular A (IgA) que é caracterizada como uma metaloprotease (LABIB; CALVANICO; TOMASI, 1975).

Uma *putative secreted protein* (*spot* 18, tabela 7, figura 15 e 17), ou seja, uma proteína secretada que não possui função estabelecida. Apresentou domínio para proteínas pertencentes à família de endopeptidase NlpC/P60. Foi identificada nas linhagens 1002 e C231. Além disso, essa proteína demonstrou similaridade com uma *putative protein invasion* de *C. diphtheriae* que esta associada à invasão celular e adesão a células epiteliais (OTT et al., 2010). Um estudo realizado em *Bacillus subtilis* demonstrou que a proteína *CwPFM* que apresenta domínio para NlpC/P60 está associada a mobilidade, adesão celular, formação de biofilme e vacuolização de macrófagos sendo considerada um fator de virulência (TRAN et al., 2010).

5.3.4 Proteínas identificadas relacionadas a processos oxidativos

C. pseudotuberculosis é um patógeno intracelular e tem se mostrado eficiente na sobrevivência à resposta imune do hospedeiro, mediada por macrófagos, a qual geralmente causa estresse oxidativo.

A *cytochrome c oxidase* (CoC) (*spot* 4, tabela 7 e figura 15 e 17) é uma enzima terminal da cadeia respiratória de mitocôndrias e bactérias anaeróbias sendo classificada em três subunidades I, II e II, que atuam na síntese de ATP, redução de nitrito, bomba de prótons (MICHEL, 1999; POPOVIC et al., 2010). O gene *sco* está amplamente distribuído em várias bactérias e promove a montagem de subtipos de CoC. Além disso, foi proposto que ele está envolvido na defesa contra o estresse

oxidativo gerado por paraquat em *Neisseria ssp.* (SEIB et al., 2003). A inativação funcional do gene *sco* em *A. tumefaciens* resultou na alteração no nível de resistência contra estresse oxidativo sugerindo que o papel fisiológico do *sco* não seja apenas para a montagem da CoC mas também para uma resposta ótima ao estresse oxidativo (SAENKHAM; VATTANAVIBOON; MONGKOLSUK, 2009).

As proteínas *superoxide dismutase* (SOD), *thiol peroxidase*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* foram detectadas somente nos géis da linhagem 1002, mas suas *ORFs* estão presentes no genoma da linhagem C231.

A *superoxide dismutase* (SOD) (*spot* 40, tabela 8 e figura 17) é uma proteína presente em quase todos os organismos, sendo estudada em diversas espécies desde bactérias ao homem. As funções da SOD estão atribuídas a defesa celular, desempenhando papel significativo durante mecanismos de patogenicidade relacionados a infecção bacteriana (LYNCH; KURAMITSU, 2000). Esta enzima desempenha um papel importante na sobrevivência de patógenos intracelulares em células fagocíticas. Um estudo demonstrou que a CuZnSOD está envolvida em mecanismos que favorecem o crescimento intracelular de *M. tuberculosis*. Esse fato foi evidenciado após observar o aumento do nível de expressão do gene *sodC* a partir da entrada deste patógeno em macrófagos humanos e sua repressão durante a persistência não-replicativa em camundongos (D'ORAZIO et al., 2001; SHI et al., 2003).

Além destas duas proteínas descritas acima, foram identificadas duas enzimas que se enquadram na lista de proteínas que geralmente estão presentes em mapas protéicos, tanto em procariotos quanto eucariotos (secretomas, lisado celular total.): (i) *thiol peroxidase* (Tpx) (*spot* 39, detalhes podem ser visualizados na tabela 9 e figura 15) proteína da subfamília das peroxidases, descrita tanto em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que atua na remoção de hidroperóxidos lipídicos produzidos em resposta ao estresse oxidativo. (ii) *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (*spot* 50, detalhes podem ser visualizados na tabela 8 e figura 15) enzima que catalisa a oxidação de glicerol-3-fosfato em diidroxiacetona fosfato, sendo também utilizada como proteína *housekeeping* em estudos de expressão gênica (PETRAK et al., 2008; HALL et al., 2009).

5.3.5 Predição da localização sub-celular das proteínas identificadas

As predições *in silico* da localização sub-celular das proteínas extracelulares das linhagens de *C. pseudotuberculosis* foram realizadas utilizando o *software* SurfG com a colaboração do aluno de doutorado Anderson Santos (programa de Pós-Graduação em Bioinformática ICB/UFMG) de acordo com a descrição de Barinov et al. (2009), com algumas modificações. Para a execução do programa de predições foi realizado um ajuste ao tamanho da membrana de *C. pseudotuberculosis*. A técnica de microscopia eletrônica foi realizada e as fotos foram analisadas, observando-se um tamanho médio de 26nm de espessura da parede da bactéria. Baseado nesta medida foi estimado que seria necessário uma quantidade mínima de 73 aminoácidos para que a extremidade da proteína não ancorada na membrana fosse exposta na superfície. Com esses dados foi possível prever as proteínas exportadas a partir do banco de dados de sequências de aminoácidos provenientes da anotação do genoma de *C. pseudotuberculosis*. A partir destes parâmetros foi criado um banco de dados com a predição *in silico* de proteínas extracelulares que resultou em 95 proteínas para a linhagem 1002 e 107 para linhagem C231.

No presente trabalho a comparação das proteínas identificadas com o banco de dados gerado pelo programa SurfG, resultou na identificação de 9 proteínas citoplasmáticas, 39 proteínas secretadas e 4 possíveis proteínas associadas à parede celular.

A presença de proteínas citoplasmáticas em análises proteômicas de proteínas extracelulares e associadas à superfície celular tem sido observada em vários microrganismos. As proteínas peroxidases, *superoxidase dismutase*, *DnaK*, *Elongation TU*, *GroEL*, *GroES*, foram identificadas em outros estudos relacionados a caracterização de proteínas extracelulares (WEHMHÖNER et al., 2003; ANTELMANN et al., 2005; RIEDEL et al., 2006; HANSMEIR et al., 2006; HANSMEIER et al., 2007). Este evento pode estar relacionado à lise celular que pode ocorrer durante o processo de extração de proteínas (WATT et al., 2005). Outra explicação pode estar associado a outras vias de secreção. Um estudo realizado em *M. tuberculosis* demonstrou que a *superoxide dismutase* apesar de não apresentar sequência de peptídeo sinal, é dependente de um sistema de secreção *SecA2*, demonstrando ser uma proteína secretada (BRAUSNTEIN et al., 2003).

A predição de peptídeo sinal das proteínas relatadas neste trabalho foram feitas pelo *software* SignalP 3.0 (BENDTSEN et al., 2004) que pode ser observado em 42 proteínas, que correspondem a 68% das proteínas identificadas, estando estas associadas ao mecanismo *Sec*-dependente. A predição para secreção por vias não clássicas foram feitas pelo programa SecretomeP 3.0 (BRENDSTEN et al., 2005a).

Uma vez que o *software* SignalP não distingue entre o sistema *Sec*-dependente e o sistema de secreção *Tat*, foi utilizado o programa TatP 1.0 (BRENDSTEN et al., 2005b) para localizar motivos *twin-arginine*. As proteínas identificadas foram: *Trehalose corynomicol transferase C*, *4 putative secreted protein*, *twin-arginine translocation pathway signal protein* e uma *putative lysozyme*. As proteínas *ABC-type transporter*, *putative secreted protein* e *Corynomycolyl transferase* foram classificadas como lipoproteínas de acordo com as análises feitas pelo programa LipoP (JUNCKER et al., 2003).

5.3.6 Análise de proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* utilizando diferentes abordagens

Pacheco et al. (2011) caracterizou o exoproteoma das linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 (70 proteínas) e C231 (67 proteínas) que resultou em 93 proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* através do método TPP/LCMS^E. No presente trabalho baseado em 2-DE associado ao MALDI-TOF-TOF, possibilitou a identificação de 55 proteínas na linhagem 1002 e 45 na linhagem C231, resultando em 60 proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis*.

Comparando as proteínas identificadas em ambos os trabalhos, pode-se evidenciar a presença de 11 proteínas que não foram identificadas no TPP/LCMS^E (Tabela 10). No entanto este fato pode estar associado à fase de crescimento bacteriano em que as proteínas foram extraídas em cada trabalho, Pacheco et al. (2011), realizou suas extrações no início da fase exponencial e neste trabalho a extração foi realizada na fase exponencial tardia, ou seja, ponto entre o meio e o fim da fase exponencial. Além disso, este fato pode estar associado também ao sistema

de separação das amostras. A união das duas técnicas possibilitou a caracterização de 104 proteínas extracelulares de *C. pseudotuberculosis* (Anexo 1).

Tabela 10: Listagem das 11 proteínas não identificadas no TPP/LCMS^E

	Proteína	ID (NCBI) ^P nas linhagens		Identificação nos géis	
		1002	C231	1002	C231
1	Hypothetical protein	ADL21703	ADL11290	Sim	Sim
2	Chaperone GroEL	ADL21673	ADL11255	Sim	Sim
3	Chaperone protein DnaK	ADL21757	ADL11343	Sim	Sim
4	Hypothetical protein	ADL21702	ADL11289	Sim	Sim
5	Hypothetical protein	ADL21704	ADL11291	Sim	Sim
6	Elongation factor P	ADL21021	ADL10611	Sim	Sim
7	Enolase	ADL20605	ADL10195	Sim	Não
8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ADL20991	ADL10581	Sim	Não
9	ABC-type transporter	ADL20391	ADL09988	Sim	Não
10	Carbonate dehydratase	ADL20477	ADL20477	Sim	Não
11	Manganese superoxide dismutase	ADL21849	ADL11437	Sim	Não

(P) Número de acesso as proteínas (projeto genoma no NCBI 40687 e 40875)

*proteína exclusiva da linhagem 1002, não foi detectada a *ORF* no genoma da linhagem C231.

Dentre as proteínas tidas como exclusivas, na linhagem 1002 neste presente trabalho, pode-se identificar 7 proteínas preditas como citoplasmáticas e Pacheco et al. (2011) identificou 15 proteínas citoplasmáticas, na linhagem C231 não foram identificadas este tipo de proteína em ambos os trabalhos. Uma possível explicação para este evento é a possibilidade da linhagem 1002 está dispondo de uma via secreção alternativa para exportar estas proteínas.

Após as análises realizadas pelo *software* SurfG, onde a predição de proteínas é baseada na presença de peptídeo sinal e por vias clássicas de secreção (*Sec*-dependente e *Sec*-independente) foi criado um banco de dados de proteínas extracelulares preditas *in silico* das linhagens 1002 e C231 de *C. pseudotuberculosis*, que resultou em 95 e 107 proteínas respectivamente. No entanto através das abordagens proteômicas baseada em sistema dependente de gel utilizada no presente trabalho (2-DE/MALDI TOF-TOF) e sistema livre de gel

(TPPLC^E) (PACHECO et al., 2011), foi possível identificar 59 e 70 proteínas extracelulares das linhagens 1002 e C231 respectivamente, ou seja, validando uma fração do total de proteínas preditas *in silico* de cada linhagem. Esta correlação entre proteínas identificadas experimentalmente e preditas por análise de bioinformática podem ser visualizadas nas figuras 18 e 19.

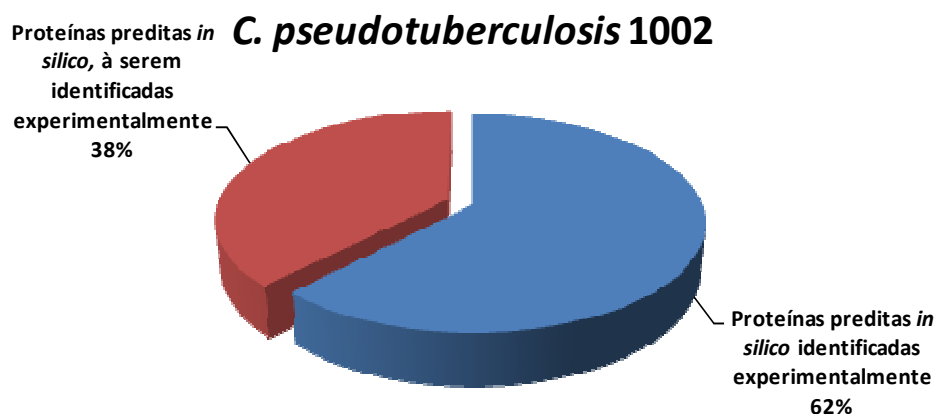


Figura 18: Proporção entre as proteínas extracelulares da linhagem 1002 preditas pelo *softwares* SurfG, identificadas experimentalmente e proteínas a serem identificadas. Foram preditas 95 proteínas *in silico*. Azul = Corresponde as 59 proteínas preditas *in silico* identificadas experimentalmente pela união dos resultados das técnicas (TPP/LCMS^E e 2-DE/MALDI TOF-TOF). Vermelho = corresponde as 36 proteínas preditas *in silico* que restam a serem identificadas experimentalmente.

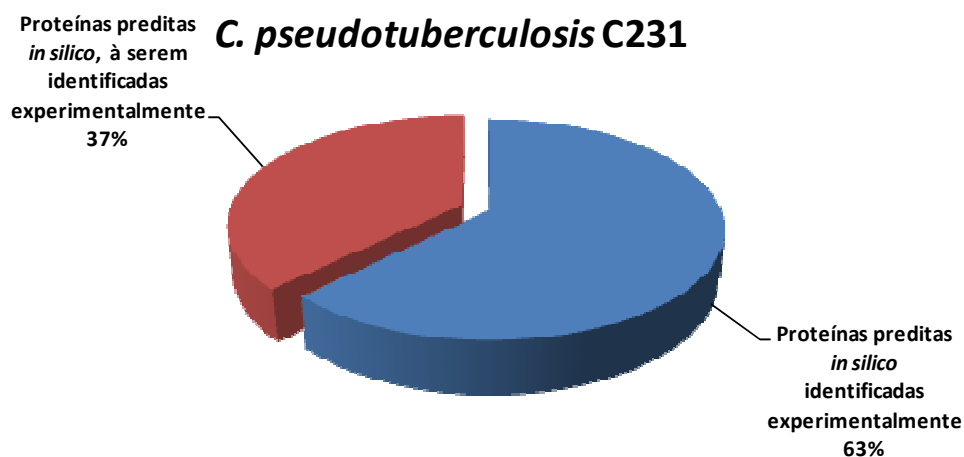


Figura 19: Proporção entre as proteínas extracelulares da linhagem C231, identificadas experimentalmente e preditas por *softwares* de bioinformática. Azul = corresponde as 70 proteínas identificadas experimentalmente pela união das técnicas (TPPLC^E e 2-DE/MALDI TOF-TOF). Foram preditas 107 proteínas *in silico*; Vermelho = corresponde o percentual de proteínas preditas *in silico* que restam a ser identificadas (37 proteínas).

5.1.1 Conclusões parte III

- ✓ Através da abordagem 2-DE/MALDI-TOF/TOF foi possível identificar as proteínas extracelulares e gerar mapas protéicos para as linhagens de *C. pseudotuberculosis* 1002 e C231 demonstrando a presença de proteínas comuns e diferentes entre as linhagens.
- ✓ Foi evidenciado que, apesar de PLD ser o principal fator de virulência e a CP40 uma proteína exclusiva da *C. pseudotuberculosis*, os *spots* protéicos referentes a estas proteínas não foram detectados nos géis da linhagem 1002.
- ✓ A caracterização do exoproteoma das duas linhagens, permitiu identificar proteínas sem função estabelecida que apresentaram domínios relacionados a proteínas envolvidas em mecanismo de virulência.
- ✓ Foi demonstrado que o uso combinado de diferentes abordagens (TPPLC^E e 2-DE/MALDI TOF-TOF) é uma importante estratégia para realizar a caracterização de um proteoma.
- ✓ Estes resultados validaram experimentalmente proteínas preditas anteriormente *in silico* e ampliaram o banco de dados de proteínas extracelulares do nosso grupo de pesquisa que detém 80 proteínas da linhagem 1002 e 74 da linhagem C231 caracterizadas experimentalmente, ou seja, várias proteínas deixaram de ser *putatives* e *hypothetical proteins*.

6 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões gerais

A utilização da eletroforese bidimensional de fluorescência diferencial para avaliar a diferença de expressão e a eletroforese bidimensional para realizar a caracterização das proteínas extracelulares das *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002 e C231 demonstrou que, apesar de pertencerem à mesma espécie, as linhagens apresentam expressão diferencial entre as proteínas comuns e possuem proteínas específicas para cada linhagem.

Estes resultados corroboram os dados obtidos com seqüenciamento do genoma das duas linhagens que apresentaram genes comuns e específicos para cada linhagem. Estas diferenças observadas no exoproteoma podem estar associadas ao tropismo por um determinado hospedeiro, adaptação e sobrevivência em um ambiente hostil no curso de infecção, que podem atuar diretamente no mecanismo de patogenicidade.

A complementação das abordagens permitiu a identificação de proteínas relacionadas ao comportamento celular e fatores de virulência que podem ser utilizados como alvos para a produção de vacinas e métodos de diagnóstico no combate a linfadenite caseosa.

6.2 Perspectivas

Os resultados obtidos neste estudo abrem perspectivas para estudo com as proteínas identificadas:

- ✓ Através de geração de linhagens mutantes e produção de proteínas heterólogas, há possibilidade de caracterizar proteínas com funções desconhecidas e avaliar suas funções neste organismo.
- ✓ Realizar estudos com as proteínas que apresentaram diferença de expressão e avaliar sua função específica em cada linhagem bacteriana.

- ✓ Avaliar o potencial imunogênico de proteínas relacionadas a fatores de virulência para seu emprego na produção de vacinas e métodos de diagnóstico.
- ✓ A *putative protein secreted*, que apresentou domínio semelhante a proteínas da família das endopeptidase NlpC/P60, teve sua região antigênica (epitopo) determinada. A sequência de peptídeos foi sintetizada em membrana e encontra-se na fase de avaliação dos peptídeos sintetizados contra um *pool* de soros de animais infectados por *C. pseudotuberculosis* e *M. tuberculosis*. Os resultados obtidos poderão fornecer informações sobre o seu possível emprego na produção de vacinas e métodos de diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* de caprinos e ovinos com linfadenite caseosa no sertão de Pernambuco. *Vet. E Zootec.*, v. 15, n. 3, p. 502-509, dez. 2008.
- ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biology*. v. 4, n. 2, p. 1-12, 2003.
- ANTELMANN, H. et al. The extracellular and cytoplasmic proteomes of the non-virulent *Bacillus anthracis* strain UM23C1-2. *Proteomics*. v. 5, p. 3684–3695. 2005.
- ALBAN, A. et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. v. 3, p. 36-44. 2003.
- ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; PIRES, P.C. Linfadenite caseosa: patogenia-diagnóstico-controle. Artigo Técnico. Documento n° 27, Sobral: CE, Embrapa. 1997.
- ALVES, F. S. F.; OLANDER, H.J. Uso de Vacina Toxóide no Controle da Linfadenite Caseosa em Caprinos. *Rev. Brasil. Med. Vet.*, v. 20, n. 2, p. 74-77. 1998.
- ALVES, F.S.F.; OLANDER, H.J. Teste de pele em caprinos vacinados e infectados com *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pesq. Agrope. Bras.*, v. 34, n. 7, p. 1313-1318. 1999.
- ARSENAULT et al. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.*, v. 59, n. 1, p. 267–281, 2003.
- ÅVALL-JAASKELAINEN, S.; PALVA, A. Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiol*. v. 29, p. 511-529, 2005.
- AWAD, F.I. Serologic investigation of pseudotuberculosis in sheep. I. Agglutination test. *Am J Vet Res*, v. 21, p. 251-253. 1960.
- BAIRD, G.J.; FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis.[S.L.] *J. Comp. Pathol.*, v. 137, n. 4, p. 179-210, set. 2007.
- BARBEY et al. Proteomic analysis and immunogenicity of secreted proteins from *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Veterinary Microbiology*. v. 135, p. 334–345, 2009.
- BARINOV, A. et al. Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *Proteomics*. v. 9, n. 1, p. 61-73. 2009.

- BATEY, R. G. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust Vet J.*, v. 63, n.9, p. 269–272. 1986.
- BENDTSEN, J. D. et al. Improved prediction of signal peptides SignalP 3.0. *J Mol Biol.* v. 340, p. 783-795. 2004.
- BENDTSEN, J. D. et al. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology.* v. 5, p. 58. 2005a.
- BENDTSEN, J. D. et al. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics.* v. 6, p. 167. 2005b.
- BENTO, A.H.L.; ZONI, M.S.F. Observações sobre a ocorrência de Linfadenite Caseosa em cabras confinadas no Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Vet.*, v. 8, n. 5, p. 136-138. 1986.
- BERKELMAN, T.; STENSTED. T. 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. Uppsala Sweden: Amersham Biosciences. 1998. Manual do fabricante. p. 100.
- BESSETTE, P.H. et al. *In Vivo* and *in Vitro* Function of the *Escherichia coli* Periplasmic Cysteine Oxidoreductase DsbG. *J biological chemistry.* v. 274, n.12, p. 7784–7792, 1999.
- BILLINGTON, S. J. et al. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J Bacteriol.* v. 180, n. 12, p. 3233-3236. 1998.
- BINNS, S.H.; GREEN, L.E.; BAILEY, M. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet. Microbiol.* v. 20, n. 1-3, p. 169-79. 2007.
- BISCH, P. M. Genômica funcional: Proteômica. In: Mir, L. *Genômica*. São Paulo: Atheneu, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* v. 7, n. 72, p. 248-254. 1976.
- BRAUSNTEIN, M. et al. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* v. 48, n. 2, p. 453-464. 2003.
- BRAITHWAITE, C.E. et al. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* v.38, p. 59-70. 1993.
- BRAVERMAN, Y. et al. The role of houseflies (*Musca domestica*) in harbouring *Corynebacterium pseudotuberculosis* in dairy herds in Israel. [S.L.] *Rev Sci Tech.* v. 18, n. 3, p. 681-690, dez.1999.

BROWN C.C. et al. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am J Vet Res.* n. 47, v. 5 p. 1116-1119. 1986.

BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; ALVES, S.F. Synergistic hemolysis-inhibition titers associated with caseous lymphadenitis in a slaughterhouse survey of goats and sheep in Northeastern Brazil. *Can J Vet Res.* v. 51, n. 1, p. 46-49. 1987.

BURRELL, D.H. A haemolysis inhibition test for detection of antibody to *Corynebacterium ovis* exotoxin. *Res Vet Sci.* v. 28, n. 2, p. 190-194. 1980.

CARNE, H.R.; ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature.* v.19, n. 5642, p.246-248.1978.

CETINKAYA, B. et al. Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol.* v. 2, n. 1, p. 75-83. 2002.

CHAKRAVARTI, B.; GALLAGHER, S. R.; CHAKRAVARTI, D. N. Difference gel electrophoresis (DIGE) using CyDye DIGE fluor minimal dyes. *Curr Protoc Mol Biol.* v. 10, 2005.

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

COSTA, L.F.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *Rev Cien. Biol.*, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2002.

CRAWFORD, H.C. et al. *Helicobacter pylori* strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 in vitro and within gastric mucosa. *Gastroenterology.* v. 125, p.1125–1136. 2003.

D' AFONSECA, V. Montagem e anotação do genoma de duas linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e genômica comparativa com espécies do gênero *Corynebacterium* sequenciadas para obtenção de conhecimento genético acerca da arquitetura genômica, genoma central e genes acessórios que compõe o repertório gênico da espécie e do gênero. Tese de Doutorado. Depto. Genética, ICB/UFMG. Belo Horizonte. 2011.

DERCKSEN, D.P. et al. Comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet Microbiol.* v. 31, n. 2, p. 167-175. 2000.

DONALDSON et al. Comparative Proteomic Analysis of *Listeria monocytogenes* Strains F2365 and EGD. *App. Environ. Microb.* v. 75, n. 2, p. 366–373, 2009.

D'ORAZIO, M. et al. Lipid modification of the Cu,Zn superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* v. 359, 17-22, 2001.

DORELLA, F. A. et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.*, v. 37, n. 2, p. 201–218. 2006.

DORELLA, et al. Sequenciamento do genoma da *Corynebacterium pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais: impactos esperados na ovino e caprinocultura nacional. In: ALMEIDA, et al. *Biotecnologia e saúde animal*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

DUBNAU, E. et al. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* v. 36, p. 630–637. 2000.

DUMAS, E. Comparative Analysis of Extracellular and Intracellular Proteomes of *Listeria monocytogenes* Strains Reveals a Correlation between Protein Expression and Serovar. *Applied Environ Microbiol.* v. 74, n. 23, p. 7399–7409, 2008.

ENCHEVA, V.; SHAH, H. N.; GHARBIA, S. E. Proteomic analysis of the adaptive response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to growth under anaerobic conditions. *Microbiology.* v. 155, n.7, p. 2429-2441. 2005.

FAYET, O.; ZIEGELHOFFER, T.; GEORGOPOULOS, C. J. The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *Bacteriol.* v.171, p.1379-85. 1989.

FENN, J. B. et al. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science.* v. 246, n. 4926, p. 64-71. 1989.

FERNÁNDEZ, et al. Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v.18, n. 6, p. 571–574, dez. 2001.

GUIMARÃES, A. S. et al. 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.

HALL, A. et al. Structural Changes Common to Catalysis in the Tpx Peroxiredoxin Subfamily. *J. Mol. Biol.* v. 393, p. 867–881, 2009.

HAN, M.J. et al. Biotechnological applications of microbes proteomes. *J Biotechnol.* v. 145, n. 4, p. 341-349. 2010.

HANSMEIER, N. et al. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Proteomics.* v. 6, p. 2465–2476, 2006.

HANSMEIER, N. A comprehensive proteome map of the lipid-requiring nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411. *Proteomics.* v. 7, p. 1076–1096, 2007.

HARD, G.C. Comparative Toxic Effect of the Surface Lipid of *Corynebacterium ovis* on Peritoneal Macrophages. *Infect. Immun.*, v. 12, n. 6, p. 1439-1449, dez.1975.

HAVLIS, J. T. et al. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analyti Chemist.* v. 75, p. 1300-1306, 2003.

HE, XIU-YUN. et al. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra. *Microbes and Infection.* v. 5, p. 851–856, 2003.

HÉMOND, V. et al. Axillary lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a 63-year-old patient. *Med Mal Infect.* 2008.

HETT, E. C. et al. A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology.* v. 66, n. 3, p. 658–668, 2007.

HIRST, R. et al. *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J. Infect. Dis.* v. 1997, p. 744–751. 2008.

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

HODGSON, et al. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.*, v. 60, n. 7, p.2900–2905, jul. 1992.

HODGSON, et al. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, v. 17, n. 7-8, p. 802–808. 1999.

HU, Y. et al. Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under metal stress by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Electrophoresis.* v.24, n. 9, p. 1458–1470. 2003.

HU, Y.; COATES, A. R. Acute and Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Infections Depend on the Thiol Peroxidase TPX. *PloS one*, v. 4, n. 4, p. 5150, 2009.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (IEA) Disponível em <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4136>. Acesso em: 15 dez. 2009.

ISSAQ, H. J.; VEENSTRA, T. D. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Bio Techniques.* v. 44, p. 697-700. 2008.

JAFFE, J. D.; BERG, H. C.; CHURCH, G. M. Proteogenomic mapping as a complementary method to perform genome annotation. *Proteomics.* v. 4, p. 59–772004.

JAHN-SCHIMD, B. et al. Toward selective elicitation of T_H1 -controlled vaccination responses: vaccine applications of bacterial surface layer proteins. *Journal of Biotechnology.* v. 44, p. 225-231. 1996.

JOIN-LAMBERT et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* n. 25, v.9, p. 848-851, 2006.

JOLLY, R.D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 29, n. 1, p. 189-196. 1966.

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

JUNCKER et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* v. 12, n. 8, p. 1652-1662. 2003.

KAJIMURA, J.; T. et al. Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* v. 58, p. 1087–1101, 2005.

KANA, B. D.; MIZRAHI, V. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *Feems Immunol Med Microbiol.* n. 58, v. 1, p. 39-50, 2009.

KAUSHIK, D. K.; SEHGAL, D. Developing Antibacterial Vaccines in Genomics and Proteomics Era. *Scandinavian Journal of Immunology.* n. 67, p. 544–552, 2008.

KICMAN, A.T.; PARKIN, M.C.; ILES, R.K. An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Mol Cell Endocrinol.* v. 260, n. 262, p. 212-227. 2007.

KIKKAWA, H.; HITOMI, S.; WATANABE, M. Prevalence of toxin A-nonproducing/toxin-B-producing *Clostridium difficile* in the Tsukuba-Tsuchiura district, Japan. *J Infect Chemother.* v. 13, p. 35–38, 2007.

KLEIN et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PloS One.* v. 5, n. 10, p.13478. 2010.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* v. 26, p. 231-243, 1975.

KUBIS, S. et al. The Arabidopsis *ppi1* Mutant Is Specifically Defective in the Expression, Chloroplast Import, and Accumulation of Photosynthetic Proteins. *Plant Cell.* v. 15, n. 8, p. 1859-1971.

LABIB, R. S.; CALVANICO, N. J.; TOMASI, T. B. Studies on extracellular proteases of *Streptococcus sanguis*. Purification and characterization of a human IgA1 specific protease. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 526, p. 547-559. 1978.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* v. 15, n. 5259, p. 680-685. 1970.

LANGENEGGER, C.H.; LANGENEGGER, J. Monitoramento sorológico e alérgico da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.11, n. 1-2, p.1-7. 1991.

LEVY, P. L. et al. Evidence of homologous relationship between thermolysin and neutral protease A of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 72, p. 4341-4345. 1975.

LIU, J.; ROSENBERG, E. Y.; NIKAIDO, H. Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 92, p. 11254–11258, 2005.

LÓPEZ, J.F.; WONG, F.M.; QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. First case of human infection. *Am J Clin Pathol.*, v. 46, n. 5, p. 562-667, 1966.

LYNCH, M.; KURAMITSU, H. Expression and role of superoxide dismutase (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes Infection*. v. 2, n. 10, p. 12.45-1255

MACKEAN, S. C.; DAVIES, J. K. MOORE, R. J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays role in macrophage death. *Microbiology*. v. 153, n. 7, p. 2203-2211, 2007.

MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. v. 382, p. 669-678. 2005.

MARTINEZ-GOMARIZ et al. Proteomic Analysis by Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis (2D DIGE) of a High-Pressure Effect in *Bacillus cereus*. *Agric Food Chem*. v. 57, p. 3543-3549, 2009.

MENZIES, P.I.; MUCKLE, C.A. The use of a microagglutination assay for the detection of antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep and goat flocks. *Can J Vet Res*. v. 53, n. 3, p. 313-318. 1989.

MILLS, A.E.; MITCHELL, R.D.; LIM, E.K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. *Pathology*. v. 29, n. 2, p. 231-233, 1997.

MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis*. v. 30, p. 156-161. 2009.

MICHEL, H. Cytochrome *c* Oxidase: Catalytic Cycle and Mechanisms of Proton Pumping-A Discussion. *Biochemistry*. v.38, p. 15129-15140, 1999.

MOURA-COSTA, L. F. et al. Meio sintético quimicamente definido para o cultivo de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Rev Bras. Saúde Prod An*. v. 3, n. 1, p. 1-9. 2002.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, G. C. *Atividades da Rede Genoma de Minas Gerais no biênio 2006-2007-apoio à Agroindústria: Sequenciamento do genoma da bactéria Corynebacterium pseudotuberculosis e identificação de genes diferencialmente expressos nas raízes de linhagens contrastantes de milho em resposta ao déficit hídrico.* Disponível em: <<http://bioinfo.cpqrr.fiocruz.br/files>> acesso em: 24 nov. 2010.

OLSON, M.E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.*, v. 66, n. 2, p. 86-92. 2002.

OTT, L. et al. Corynebacterium diphtheriae invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells *BMC Microbiology.* v.10, n. 2, 2010.

PACHECO, L.G.C. et al. 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, n. 4, p. 480-486. 2007.

PACHECO, L.G.C et al. A combined approach for comparative exoproteome analysis of Corynebacterium pseudotuberculosis. *BMC Microbiology.* V. 11, v. 12, p. 1-14, 2011.

PAN, S. et al. Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J Proteome Res.* v. 8, n. 2, p. 787-797. 2009.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* v. 405, n. 15, 2000.

PATON, M. W. et al. New infection with Corynebacterium pseudotuberculosis reduces wool production. *Aust. Vet. J.*, v. 71, n. 2, p. 47-49. 1994.

PAULE, J.B.A. et al., Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-g production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. *Vet Immun Immunopath.* v. 96, p.129-139, 2003.

PAULE, J.B.A. et al. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of Corynebacterium pseudotuberculosis. *Protein Expr. Purif.* v.34, p. 311-166. 2004.

PEEL, M. M. et al. Human lymphadenitis due to Corynebacterium pseudotuberculosis: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.*, v. 24, n. 2, p. 185-191, fev. 1997.

PETRAK, J. et al. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics.* v. 8, p. 1744-1749. 2008.

PINHEIRO, R.R. et al. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 52, n. 5, p. 534-543, out. 2000.

PIONTKOWSKI, M. D.; SHIVVERS, D. W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J Am Vet Assoc.* v. 212, n. 11, p. 1765-1768. 1998.

POCSFALVI, G. et al. Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Proteomics.* v. 8, p. 2462–2476, 2008.

POPOVIC, D. M. et al. Similarity of cytochrome c oxidases in different organisms. *Proteins.* v. 78, p. 2691–2698, 2010.

PRODHAN, M.A.; OLANDER, H.J.; GARDNER, I.A. A comparison of dot-blot assay with the synergistic haemolytic inhibition test in goats naturally infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet Res Commun.*, v. 17, n. 3, p. 193-196, 1993.

QAMRA et al. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* v. 85, p. 385-394. 2005.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.* 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RATHSAM et al. Two-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoretic Analysis of *Streptococcus mutans* Biofilms. *J Proteome Research.* v. 4, p. 2161-2173, 2005.

RAVAGNANI, A. et al. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. *BMC Genomics.* v.6, n. 39. 2005.

REDPATH, M.B.; FOSTER, T. J.; BAILEY, C. J. The role of the serine protease active site in the mode of action of epidermolytic toxin of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* v. 65, n. 2, p. 151-155. 1991.

REEVES, G. A.; TALAVERA, D.; THORNTON, J. M. Genome and proteome annotation: organization, interpretation and integration. *Journal of Royal Society Interface.* v. 6, p.129–147. 2009.

REDE DE TECNOLOGIA SOCIAL. Disponível em <http://www.rts.org.br/noticias/destaque-4/noticias-gerais>. Acesso em: 21 dez. 2010.

RIBEIRO. M. G. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arq. Inst Biol.* v. 68, n. 1, p. 23-28. 2001.

RIEDEL, K. et al. Towards the proteome of *Burkholderia cenocepacia* H111: Setting up a 2-DE reference map *Proteomics*. v. 6, p. 207–216, 2006.

ROMERO-PÉREZA, J.C.; SUÑER-MACHADO, M.; BATISTA-DÍAZ, N. Linfadenitis por *Corynebacterium pseudotuberculosis* en una paciente joven. *Rev Clin Esp.*, v. 204, n. 7, p. 388-390, 2004.

ROSEN, R. et al. Two-dimensional reference map of *Agrobacterium tumefaciens* proteins. *Proteomics*, v. 4, p. 1061–1073. 2004.

RUGGIERO, et al. Crystal structure of the resuscitation-promoting factor (DeltaDUF) RpfB from *M. tuberculosis*. *J Mol Biol.* v. 385, n. 1, p. 153-162. 2008.

RYOO, S. W. et al. Comparative Proteomic Analysis of Virulent Korean *Mycobacterium tuberculosis* K-strain with Other Mycobacteria Strain Following Infection of U-937 Macrophage. *The Journal of Microbiology.* v. 45, n. 3, p. 268-271, 2007.

SAENKHAM, P.; VATTANAVIBOON, P.; MONGKOLSUKMUTATION, Mutation in *scdA* affects cytochrome *c* assembly and alters oxidative stress resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. *PFEMS Microbiol Lett.* v. 293, p. 122–129. 2009.

SARA, M.; SLEYTER, U.B. S-Layer proteins. *J Bacteriol.* v. 182, n. 4, p. 859-868. 2000.

SCHREUDER, B.E.; Ter Laak, E.A.; de GEE, A.L. *Corynebacterium pseudotuberculosis* in milk of CL affected goats. *Vet Rec.* v. 13, n. 15, p. 387. 1990.

SELA-ABRAMOVICH, et al. Novel and Unique Diagnostic Biomarkers for *Bacillus anthracis* Infection. *Applied and environmental microbiology.* v. 75, n. 19, p. 6157–6167, 2009.

SELIM, A.S. Oedematous skin disease of buffalo in Egypt. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* v. 48, n. 4, p.241–258, 2001.

SERGEEV, N., et al. Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay. *J. Clin. Microbiol.* n. 42, p. 2134–2143. 2004.

SEYFFERT, N. et al. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. *Research in Veterinary Science.* v.88, p. 50–55, 2010a.

SEYFFERT, N. et al. Serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J integratedomics.* Artigo submetido. 2010b.

SHIGIDI, M.T. A comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *Br Vet J.* v. 135, n. 2, p. 172-177. 1979.

SHI, L. et al. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a Mycobacterium tuberculosis transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *PNAS*. v. 100, n. 1, p. 241–246, 2003.

SHIMAKATA, T.; MINATOGAWA, Y. Essential Role of Trehalose in the Synthesis and Subsequent Metabolism of Corynomycolic Acid in *Corynebacterium matruchotii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 380, n. 2, p. 331–338, 2000.

SIMPSON, R.J. Proteins and Proteomics a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, 2003.

SONGER, et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* v. 49, n. 2, p. 223–226, fev. 1988.

SONGER, et al. Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*. [S.L.] *Infect. Immun.*, v. 58, n. 1, p. 131-136, jan. 1990.

SONGER, J. G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* v. 5, n. 4, p. 156-160. 1997.

SPEICHER, K.D. K., O.; HARPER, S.; SPEICHER, D. W. Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestion for protein identifications in proteome studies. *J. Biomol. Tech.* v.11, p. 74–86. 2000.

STANDFORD, K. et al. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Can. J. Vet. Res.*, v. 62, n. 1, p. 38-43.1998.

SUTHERLAND, S.S. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Aust Vet J.* v. 64, n. 9, p. 263-266. 1987.

TAKAYAMA, K. et al. Transposon-5 mutagenesis transforms *Corynebacterium matruchotii* to synthesize novel hybrid fatty acids that functionally replace corynomycolic acid. *Biochem. J.* v. 373, p. 465–474, 2003.

TANNU, N. S.; HEMBY, S. E. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat. Protoc.* v. 1, p. 1732–1742. 2006.

THOMSON, J.J. On the appearance of helium and neon in vacuum tubes. *Science*. v. 7, n. 37, p. 360-364.1913.

TRAN, S. et al. CwpFM (EntFM) Is a *Bacillus cereus* Potential Cell Wall Peptidase Implicated in Adhesion, Biofilm Formation, and Virulenc. *J. Bacteriology*. v. 192, n. 10, p. 2638–2642, 2010.

TROST M. et al. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Proteomics*. v. 5, p. 1544–1557, 2005.

UNLU, M.; MORGAN, M.E.; MINDEN, J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. v. 18, n. 11, p. 2071-2077. 1997.

Van BOGELEN, R. A. et al. Dianosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis*. v. 20, p. 2149-2159. 1999.

Van den BERGH, G. et al. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identify age-related protein expression differences for the primary visual cortex of kitten and adult cat. *J Neurochem*. v. 85, n. 1, p. 193-205. 2003.

VIERSTRAETE, E. et al. A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 101, n. 2, p. 470-475.

WALTHER, T. C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol*. v. 23, n. 4, p. 491-500, 2010.

WATT, S. A. et al. Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics*. v.5, p. 153–167. 2005.

WEHMHÖNER, D. et al. Inter- and Intraclonal Diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* Proteome Manifests within the Secretome. *J. Bacteriol.*v. 185, p. 5807–5814. 2003.

WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v. 17, n. 2, p. 359–371, jul. 2001.

WILSON, M. J.; BRANDON, M. R.; WALKER, J. Molecular and Biochemical Characterization of a Protective 40- Kilodalton Antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and immunity*. v. 63, n. 1, p. 206-211. 1995.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol*. v. 66, p. 41–48. 1970.

WU, Z.; ZHANG, W.; LU, C. Comparative proteome analysis of secreted proteins of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates from diseased and healthy pigs. *Microbial Pathogenesis*. v. 45, p. 159–166, 2008.

WU, H. J.; WANG, A. H.; JENNINGS, M. P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol*. v. 12, n. 1, p. 93-101. 2008.

XAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J.R. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. v. 12, n. 5, p. 483-490. 2008.

ZALUZEC, E.J.; GAGE, D.A.; WATSON, T. Matrix-assited laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. *Protein Expr Purif*. v. 6, n. 2, p. 109-123, 1995.

ZHOU, G. et al. 2D Differential In-gel Electrophoresis for the Identification of Esophageal Scans Cell Cancer-specific Protein Markers. *Moll Cell Proteomics*. v. 1, n. 2 p. 117-124. 2002.

ZHU, H.; BILGIN, M.; SNYDER, M. Proteomics. *Annu Rev Bilchem*. v. 72, p. 783-812. 2003.

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1

Anexo 1: Lista das 104 proteínas extracelulares de <i>C. pseudotuberculosis</i> detectadas por ambas abordagens experimentais: 2D-PAGE/MALDI-TOF-TOF e LC-MS ^E						
Proteína		ID (NCBI) ^P 1002 C231		<u>MW(kDa)/P.I</u>	Predição SurfG+	Referência
1	Putative secreted protein	ADL21925	ADL11512	14.54/4.88	S	This work and Pacheco et al., 2011
2	Putative secreted protein	ADL21714	ADL11301	40.90/5.05	S	This work and Pacheco et al., 2011
3	Cytochrome c oxidase subunit 2	ADL21302	ADL10895	40.33/6.03	PSE	This work and Pacheco et al., 2011
4	Trypsin-like serine protease	ADL20555	ADL10144	48.98/5.29	S	This work and Pacheco et al., 2011
5	Putative trypsin-like serine protease	ADL20653	ADL10245	25.72/6.49	S	This work and Pacheco et al., 2011
6	Putative secreted protein	ADL20288	ADL09881	26.80/9.07	S [#]	This work and Pacheco et al., 2011
7	Hypothetical protein	ADL09626	ADL09626	24.30/9.24	S	This work and Pacheco et al., 2011
8	Conserved hypothetical protein	ADL19922	ADL09511	19.86/4.30	S	This work and Pacheco et al., 2011
9	Resuscitation-promoting factor A	ADL20487	ADL10080	21.52/6.07	S	This work and Pacheco et al., 2011
10	Putative hydrolase	ADL19973	ADL09563	40.28/5.58	S [#]	This work and Pacheco et al., 2011
11	Surface layer protein A	ADL20140	ADL09734	38.67/5.90	S	This work and Pacheco et al., 2011
12	NLP/P60 protein	ADL21293	ADL10887	36.63/5.62	S	This work and Pacheco et al., 2011
13	Putative protein secreted	ADL10547	ADL10547	63.17/5.59	S	This work and Pacheco et al., 2011
14	Putative serine protease	ADL20429	ADL10025	31.47/9.59	S	This work and Pacheco et al., 2011
15	Trehalose corynomocolyl transferase B	ADL21814	ADL11402	36.67/6.90	S	This work and Pacheco et al., 2011
16	Trehalose corynomocolyl transferase C	ADL21812	ADL11400	70.34/5.61	S [#]	This work and Pacheco et al., 2011
17	Putative secreted protein	ADL20770	ADL10365	30.07/5.19	S	This work and Pacheco et al., 2011
18	Putative secreted hydrolase	ADL20134	ADL09728	29.04/8.83	S	This work and Pacheco et al., 2011
19	Resuscitation-promoting factor RpfB	_ADL20574	ADL10163	40.31/5.06	S	This work and Pacheco et al., 2011

20	Putative secreted metalloendopeptidase	ADL20536	ADL10125	24.83/7.23	PSE	This work and Pacheco et al., 2011
21	Corynomycolyl transferase	ADL21610	ADL11196	41.80/7.05	S ^{\$}	This work and Pacheco et al., 2011
22	Putative twin-arginine translocation pathway signal protein	ADL20508	ADL10099	31.65 / 9.52	S [#]	This work and Pacheco et al., 2011
23	Putative trypsin-like serine protease	ADL20466	ADL10062	41.00 / 8.53	S [#]	This work and Pacheco et al., 2011
24	Putative exported lipase	ADL21667	ADL11248	44.04 / 5.03	S	This work and Pacheco et al., 2011
25	co-chaperonin GroES	ADL20318	ADL09912	10.60 / 4.49	C	This work and Pacheco et al., 2011
26	Elongation factor Tu	ADL20240	ADL09833	44.00 / 4.86	C	This work and Pacheco et al., 2011
27	Peroxiredoxin	ADL21047	ADL10638	15.70 / 4.56	C	This work and Pacheco et al., 2011
28	Phosphoglycerate kinase	ADL20990	ADL10580	42.60 / 4.68	C	This work and Pacheco et al., 2011
29	Phospholipase D (PLD)	ADL19935	ADL09524	32.45 / 8.77	S	This work and Pacheco et al., 2011
30	Serine proteinase precursor (CP40)	ADL21753	ADL11339	43.00 / 6.48	S	This work and Pacheco et al., 2011
31	Putative secreted protein	ADL20097	ADL09691	51.41/5.43	S [#]	This work and Pacheco et al., 2011
32	Putative secreted protein	ADL20656	ADL10248	24.39/5.34	S ^{\$}	This work and Pacheco et al., 2011
33	*Putative DsbG protein	ADL21555		26.67/5.43	C	This work and Pacheco et al., 2011
34	GroEL chaperonin	ADL21673	ADL11255	57.12/4.72	C	This work
35	Hypothetical protein	ADL21702	ADL11289	10.89/5.16	S	This work
36	Hypothetical protein	ADL21704	ADL11291	8.97/5.82		This work
37	Elongation factor P	ADL21021	ADL10611	20.57/5.24	S	This work
38	Hypothetical protein	ADL21703	ADL11290	87.79/5.09	S	This work
39	Chaperone protein DnaK	ADL21757	ADL11343	65.61/4.68	C	This work
40	Manganese superoxide dismutase	ADL21849	ADL11437	22.08/5.07	C	This work
41	Carbonate dehydratase	ADL20477	ADL10071	26.17/6.24	S	This work

42	ABC-type transporter	ADL20391	ADL09988	46.01/4.80	S ^s	This work
43	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)	ADL20991	ADL10581	36.37/5.35	C	This work
44	Enolase	ADL20605	ADL10195	45.17/4.68	S	This work
45	Hypothetical protein	ADL20222	ADL09817	44.10 / 9.24	PSE	Pacheco et al., 2011
46	Putative exported esterase hydrolase	ADL20788	ADL10383	32.90 / 6.20	C	Pacheco et al., 2011
47	Putative heme transport associated protein	ADL20347	ADL09942	64.00 / 5.82	PSE	Pacheco et al., 2011
48	Putative efflux system protein	ADL21747	ADL11333	59.60 / 5.60	PSE	Pacheco et al., 2011
49	Putative phosphatase	ADL09864	ADL09864	44.31 / 7.76	S	Pacheco et al., 2011
50	Putative surface-anchored membrane protein	ADL20074	ADL09668	118.41/5.68	PSE	Pacheco et al., 2011
51	Putative sialidase precursor	ADL20287	ADL09880	75.00 / 5.05	S	Pacheco et al., 2011
52	Putative peptide transport system secreted protein	ADL20650	ADL10241	57.30 / 4.88	PSE ^s	Pacheco et al., 2011
53	Putative membrane protein	ADL21840	ADL11428	41.30/5.83	PSE	Pacheco et al., 2011
54	Putative peptidoglycan recognition protein	ADL21828	ADL11416	70.00 / 5.00	S	Pacheco et al., 2011
55	Secreted subtilisin-like peptidase	ADL21499	ADL11094	64.54 / 5.38	S	Pacheco et al., 2011
56	Putative peptidyl prolyl cis trans isomerase A	ADL19928	ADL09517	19.30 / 4.82	S	Pacheco et al., 2011
57	Hemin receptor precursor	ADL20348	ADL09943	40.50 / 4.96	PSE ^s	Pacheco et al., 2011
58	Putative membrane protein	ADL21275	ADL10868	24.61/10.24	PSE	Pacheco et al., 2011
59	Cell-surface hemin receptor	ADL21841	ADL11429	71.00 / 5.47	PSE	Pacheco et al., 2011
60	Conserved hypothetical protein	ADL21628	ADL11211	19.50 / 5.30	S [#]	Pacheco et al., 2011

61	*PAP2 phosphatase		ADL09864	44.21 / 7.90	S	Pacheco et al., 2011
62	Putative cell-surface hemin receptor	ADL21338	ADL10936	84.15 / 5.40	PSE	Pacheco et al., 2011
63	Putative secreted protein	ADL20455	ADL10051	22.00 / 6.59	S	Pacheco et al., 2011
64	Putative amino deoxychorismate lyase	ADL21028	ADL10619	41.10 / 5.12	S ^s	Pacheco et al., 2011
65	Putative secreted protein	ADL21239	ADL10832	23.07 / 4.59	PSE ^s	Pacheco et al., 2011
66	ABC superfamily ATP binding cassette transporter	ADL20218	ADL09813	57.80 / 5.15	PSE ^s	Pacheco et al., 2011
67	Putative membrane protein	ADL20351	ADL09946	32.54 / 8.58	PSE	Pacheco et al., 2011
68	Phosphoglyceromutase	ADL20161	ADL09755	27.51 / 5.25	C	Pacheco et al., 2011
69	Putative HtaA family protein	ADL21337	ADL10935	32.00 / 8.55	PSE	Pacheco et al., 2011
70	Elongation factor Ts	ADL21187	ADL10779	29.40 / 5.06	C	Pacheco et al., 2011
71	Transcription elongation factor GreA	ADL20612	ADL10202	19.01 / 4.83	C ^{&}	Pacheco et al., 2011
72	Conserved hypothetical protein	ADL20222	ADL09817	15.35 / 8.72	C ^{&}	Pacheco et al., 2011
73	Conserved hypothetical protein	ADL21049	ADL10640	11.60 / 9.30	M	Pacheco et al., 2011
74	Triosephosphate isomerase	ADL20989	ADL10579	27.35 / 4.99	C	Pacheco et al., 2011
75	Conserved hypothetical protein	ADL21342	ADL10940	7.26 / 4.62	C ^{&}	Pacheco et al., 2011
76	Putative carbohydrate carrier protein	ADL21114	ADL10706	9.1 / 4.06	C	Pacheco et al., 2011
77	FHA domain protein (OdhI)	ADL20881	ADL10473	15.34 / 4.80	C	Pacheco et al., 2011
78	Putative methylmalonyl CoA epimerase	ADL20739	ADL10334	16.70 / 4.89	C	Pacheco et al., 2011
79	Putative lipoprotein	ADL19972	ADL09562	48.50 / 4.71	C	Pacheco et al., 2011

80	*Hypothetical protein		ADL11253	6.64 / 4.93	C	Pacheco et al., 2011
81	NLP/P60 family secreted protein	ADL21294	ADL10888	21.41 / 7.00	S	Pacheco et al., 2011
82	Substrate-binding protein	ADL21914	ADL11501	123.00/ 5.04	PSE	Pacheco et al., 2011
83	Putative penicillin-binding protein	ADL21890	ADL11477	77.16 / 8.67	PSE	Pacheco et al., 2011
84	Putative surface-anchored protein	ADL21911	ADL11498	90.60 / 5.10	PSE	Pacheco et al., 2011
85	*Hypothetical protein		ADL10001	27.21 / 4.77	S	Pacheco et al., 2011
86	Putative secreted protein	ADL20404	ADL09871	16.80 / 8.30	S	Pacheco et al., 2011
87	*Conserved hypothetical exported protein		ADL10384	49.61 / 8.69	S	Pacheco et al., 2011
88	Hypothetical protein	ADL21630	ADL11213	33.55 / 4.48	S	Pacheco et al., 2011
89	*Putative secreted protein	ADL21537		23.4 / 9.36	S	Pacheco et al., 2011
90	Putative secreted protein	ADL20898	ADL10489	24.73 / 5.07	S	Pacheco et al., 2011
91	Secreted penicillin-binding protein	ADL19443	ADL09532	50.75 / 5.67	S	Pacheco et al., 2011
92	Putative surface-anchored protein	ADL21758	ADL11344	27.85 / 9.24	S	Pacheco et al., 2011
93	Putative penicillin-binding secreted protein	ADL20103	ADL09697	83.00 / 5.38	S	Pacheco et al., 2011
94	Putative membrane anchored protein	ADL21752	ADL11338	21.15 / 9.59	S	Pacheco et al., 2011
95	Hypothetical protein	ADL21739	ADL11326	34.65 / 5.85	S	Pacheco et al., 2011
96	Transcriptional regulator	ADL20393	ADL09990	55.05 / 4.97	PSE	Pacheco et al., 2011
97	Putative serine threonine protein kinase	ADL21286	ADL10880	80.10 / 4.80	PSE	Pacheco et al., 2011
98	Putative extracellular solute-binding protein	ADL20259	ADL09852	61.54 / 5.31	PSE	Pacheco et al., 2011

99	Maltotriose-binding protein	ADL20278	ADL09872	43.93 / 5.07	PSE ^{\$}	Pacheco et al., 2011
100	Putative zinc metallopeptidase	ADL26425	ADL10626	35.38 / 5.29	PSE	Pacheco et al., 2011
101	Putative iron transport system binding (secreted) protein	ADL20866	ADL10460	30.05 / 5.16	PSE ^{\$}	Pacheco et al., 2011
102	Glycerophosphoryl diesterphosphodiesterase	ADL21822	ADL11410	40.28 / 5.13	PSE ^{\$}	Pacheco et al., 2011
103	Putative metal-binding like protein	ADL10663	ADL21072	20.81 / 5.48	PSE ^{\$}	Pacheco et al., 2011
104	Iron siderophore binding protein – FagD	ADL19939	ADL09528	37.47 / 5.05	PSE ^{\$}	Pacheco et al., 2011
<p>C = citoplasmático; M = membrana; PSE = potencialmente exposta à superfície celular; S = secretada (#) Predição peptídeo sinal associado-Tat (\$) Predita como lipoproteína (&) SecretomeP prediction of non-classical secretion. (P) Número de acesso as proteínas (projeto genoma no NCBI 40687 e 40875). (*) <i>ORF</i> detectada somente no genoma de uma das linhagens. O ponto isoelétrico (p.I) e peso molecular (kDa) teórico foram calculados utilizando o programa <i>ExPASy Tools</i>.</p>						

7.2 Anexo 2

Currículo lattes

Wanderson Marques da Silva

Formação Acadêmica/Titulação

- 2009** Mestrado Profissionalizante em Fisiologia e Farmacologia.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: Identificação e caracterização do exoproteoma de duas linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* através das técnicas de 2D-DIGE e espectrometria de massa
Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2008 - 2009** Especialização em Microbiologia.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
Título: Novas perspectivas na elaboração de um diagnóstico subclínico para linfadenite caseosa através da técnica de Phage Display
Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
- 2004 - 2007** Graduação em Biomedicina.
Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Belo Horizonte, Brasil
Título: História da Arte da Linfadenite Caseosa e o Genoma de seu agente etiológico *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
Orientador: Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
-

Formação complementar

- 2010 - 2010** Proteomic Analysis.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Aplicações da PCR Quantitativa em Tempo Real.
Universidade Federal do Pará, UFPA, Belem, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Citogenética molecular no diagnóstico e pesquisa.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Atualização Clínico-Patológica em HPV.
Sociedade Brasileira de Patologia, SBP, Sao Paulo, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em 1º Seminário de Atualização em Biomedicina.
Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Belo Horizonte, Brasil
-

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Vínculo institucional

2009 - Atual	Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado, Regime: Dedicção Exclusiva
2008 - 2009	Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Especializando , Carga horária: 40, Regime: Integral
2007 - 2007	Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

2009 - Atual	Projetos de pesquisa, Instituto de Ciências Biológicas <i>Participação em projetos: Análise de proteínas extracelulares de linhagens de Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
2008 - Atual 2007 - 2007	Projetos de pesquisa, Instituto de Ciências Biológicas Estágio, Instituto de Ciências Biológicas <i>Estágio: Estágio realizado Laboratorio de Genética Celular e Molecular</i>

2. Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte - IEP-SCBH

Vínculo institucional

2005 - 2007	Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 36, Regime: Parcial
--------------------	---

Atividades

09/2005 - 06/2007	Estágio, Anatomia Patológica <i>Estágio: Estágio realizado no setor de Microscopia optica, Macroscopia e Necropsia</i>
--------------------------	---

3. Instituto Moacir Junqueira - IMJ

Vínculo institucional

2007 - 2007	Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiario , Carga horária: 36, Regime: Parcial
--------------------	---

Atividades

07/2007 - 12/2007 Estágio, Citologia

Estágio:

Estágio no setor de Microscopia Óptica Citologia Cérvico-vaginal

Projetos

2009 - Atual Análise de proteínas extracelulares de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Integrantes: Wanderson Marques da Silva; Vasco Azevedo - Coordenador (Responsável); Luis Gustavo Carvalho Pacheco; Núbia Seyffert; Anderson Miyoshi; Artur Silva

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

Áreas de atuação

1. Anatomia Patológica e Patologia Clínica
2. Biologia Molecular
3. Microbiologia Aplicada

Idiomas

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

Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. PACHECO, L. G. C, SUSAN,, SEYFFERT, N., SANTOS, A.R, CASTRO, T. L. P., SILVA, W. M. SILVA, W, SANTOS, A. V., SANTOS, S. G., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A., PIMENTA, A., MEYER, R., SILVA, A., SCRIVENS, J. H., OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, A., DOWNSON, C. G., AZEVEDO, V.

A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. BMC Microbiology (Online). , v.11, p.00 - 00, 2011.

2. CHAGAS, S. A. P., NUNES, M. B., SOUZA, R. T. P. E., SILVA, W. M. SILVA, W Malacoplaquia na língua : relato de caso. Brazilian journal of otorhinolaryngology (Online). , v.75, p.910 - , 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. SOUZA, R. T. P. E., NUNES, M. B., CHAGAS, S. A. P., SILVA, W. M. SILVA, W, MIRANDA, R. H.

Hibernoma: relato de caso In: 1º Congresso de Medicina da Santa Casa de Belo Horizonte e 3º Encontro de Iniciação Científica e Pesquisa do Grupo Sta. Casa, 2006, Belo Horizonte.

1º Congresso de Medicina da Santa Casa de Belo Horizonte. , 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, W. M. SILVA, W, SEYFFERT, N., PACHECO, L. G. C, CIPRANDI, A., SANTOS, A. V., PIMENTA, A., SILVA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.
Análise comparativa dos secretomas de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de pequenos ruminantes In: VI Fórum de Microbiologia, 2010, Belo Horizonte.
VI Fórum de Microbiologia. , 2010.
2. SILVA, W. M. SILVA, W, SEYFFERT, N., PACHECO, L. G. C, CIPRANDI, A., SANTOS, A. V., CASTRO, T. L. P., PIMENTA, A., SILVA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.
Análise da expressão diferencial de proteínas extracelulares de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de diferentes hospedeiros In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá.
Anais do 56º Congresso Brasileiro de Genética. , 2010.
3. SOARES, S. C., Almeida, S.S., SEYFFERT, N., SILVA, W. M. SILVA, W, RIBEIRO, D., SANTOS, F.A.A, PRUDENCIO, C.R, MIYOSHI, A., VIERA, C.U, AZEVEDO, V.
Construção de uma biblioteca de SCFV para identificação de proteínas imunogênicas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* com o potencial vacinal In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá.
Anais do 56º Congresso Brasileiro de Genética. , 2010.
4. SILVA, W. M. SILVA, W, SEYFFERT, N., Alves, L.M.C, PACHECO, L. G. C, DORELLA, F. A., CASTRO, T. L. P., GUIMARAES, L. C., SILVA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.
Análise comparativa dos secretomas de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de pequenos ruminantes In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2009.
5. SEYFFERT, N., PACHECO, L. G. C, SILVA, W. M. SILVA, W, Alves, L.M.C, SANTOS, A. V., RODRIGUES, M. R., CASTRO, T. L. P., PIMENTA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.
Caracterização de proteínas secretadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2009.
6. CIPRANDI, A., SILVA, W. M. SILVA, W, AZEVEDO, V., SCHNEIDER, M. P., SILVA, A.
Caracterização parcial do secretoma de *Chromobacterium violaceum* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2009.
7. GUIMARAES, L. C., BARAUNA, R. A., LAMEIRA, J., SCHNEIDER, M. P., MIYOSHI, A., SILVA, W. M. SILVA, W, SILVA, A., AZEVEDO, V.
Modelagem Molecular do Monômero de Estrutura da Enzima Cianase Proveniente de *Chromobacterium violaceum* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2009.
8. Alves, L.M.C, SEYFFERT, N., SARAIVA, T. D. L., GRYNBERG, P., SILVA, W. M. SILVA, W, PACHECO, L. G. C, DORELLA, F. A., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.
Produção e caracterização de uma proteína secretada exclusiva de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para o diagnóstico da linfadenite caseosa In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2009.
9. SILVA, W. M. SILVA, W, SEYFFERT, N., SANTOS, B.M.N, PRUDENCIO, C. R., PACHECO, L. G. C, CASTRO, T. L. P., DORELLA, F. A., CERQUEIRA, P. G., PINTO, A. C., D'Afonseca, V., PORTELA, R. W., SOARES, S. C., MAHECHA, G. A. B., GOULART, L. R., MEYER, R., MIYOSHI, A., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., AZEVEDO, V.
Identificação de epítomos da superfície de fagos para o imunodiagnóstico da Linfadenite Caseosa em caprinos In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.
Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética. , 2008.

10. PACHECO, L. G. C, CASTRO, T. L. P., SEYFFERT, N., DORELLA, F. A., PINTO, A. C., D'Afonseca, V., SOARES, S. C., BUCKER, D. H., MORAES, P. M. R. O., CERQUEIRA, P. G., SILVA, W. M. SILVA, W, RIBEIRO, D., SANTOS, S. G., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A. R., PIMENTA, A., MEYER, R., MIYOSHI, A., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V.

Papael do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência In: 54^º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética. , 2008.

11. PACHECO, L. G. C, CASTRO, T. L. P., SEYFFERT, N., DORELLA, F. A., PINTO, A. C., DAFONSECA, V., SOARES, S. C., BUCKER, D. H., MORAES, P. M. R. O., CERQUEIRA, P. G., SILVA, W. M. SILVA, W, RIBEIRO, D., SANTOS, S. G., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A. R., PIMENTA, A., MEYER, R., MIYOSHI, A., OLIVEIRA, S. C., AZEVEDO, V.

Papel do fator sigma E de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na resistência ao estresse e na regulação de fatores associados à virulência. In: I Encontro de Alunos e Ex-alunos do PG Genética - Professora Cleusa Graça da Fonseca, 2008, Belo Horizonte.

I Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFMG. , 2008.

12. SILVA, W. M. SILVA, W, SEYFFERT, N., SANTOS, B.M.N, PRUDENCIO, C. R., PACHECO, L. G. C, CASTRO, T. L. P., DORELLA, F. A., CERQUEIRA, P. G., PINTO, A. C., D'Afonseca, V., PORTELA, R. W., SOARES, S. C., MAHECHA, G. A. B., GOULART, L. R., MEYER, R., MIYOSHI, A., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., AZEVEDO, V.

Uso de Phage Display na seleção de peptídeos para o diagnóstico da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes In: 26^a Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador.

Anais da 26ª Reunião de Genética de Microrganismos. , 2008.

13. CHAGAS, S. A. P., NUNES, M. B., SOUZA, R. T. P. E., SILVA, W. M. SILVA, W, Sales, J. O, OLIVEIRA, J. B.

Malacoplaquia na língua: relato de caso In: 1^º Congresso de Medicina da Santa Casa de Belo Horizonte e 3^º Encontro de Iniciação Científica e Pesquisa do Grupo Sta. Casa, 2006, Belo Horizonte.

1º Congresso de Medicina da Santa Casa de Belo Horizonte. , 2006.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **VI Fórum de Microbiologia**, 2010. (Simpósio)

Análise comparativa dos secretomas de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de pequenos ruminantes.

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

Análise da expressão diferencial de proteínas extracelulares de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de diferentes hospedeiros.

3. Apresentação (Outras Formas) no(a) **25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 2009. (Congresso)

Análise comparativa dos secretomas de linhagens de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isoladas de pequenos ruminantes.

4. **9º Patoshow Jornada de Patologia**, 2007. (Outra)

5. **53º Congresso Brasileiro de Genética**, 2007. (Congresso)

7.2 Anexo 3

Artigos publicados

Pacheco et al. *BMC Microbiology* 2011, **11**:12
<http://www.biomedcentral.com/1471-2189/11/12>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Luis GC Pacheco^{1,2,3}, Susan E Slade⁴, Núbia Seyffert², Anderson R Santos², Thiago LP Castro², Wanderson M Silva², Agenor V Santos¹, Simone G Santos⁵, Luiz M Farias⁵, Maria AR Carvalho⁵, Adriano MC Pimenta¹, Roberto Meyer³, Artur Silva⁶, James H Scrivens⁴, Sérgio C Oliveira¹, Anderson Miyoshi², Christopher G Dowson⁴, Vasco Azevedo^{2*}

Abstract

Background: Bacterial exported proteins represent key components of the host-pathogen interplay. Hence, we sought to implement a combined approach for characterizing the entire exoproteome of the pathogenic bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the etiological agent of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep and goats.

Results: An optimized protocol of three-phase partitioning (TPP) was used to obtain the *C. pseudotuberculosis* exoproteins, and a newly introduced method of data-independent MS acquisition (LC-MS⁵) was employed for protein identification and label-free quantification. Additionally, the recently developed tool SurfG+ was used for *in silico* prediction of sub-cellular localization of the identified proteins. In total, 93 different extracellular proteins of *C. pseudotuberculosis* were identified with high confidence by this strategy; 44 proteins were commonly identified in two different strains, isolated from distinct hosts, then composing a core *C. pseudotuberculosis* exoproteome. Analysis with the SurfG+ tool showed that more than 75% (70/93) of the identified proteins could be predicted as containing signals for active exportation. Moreover, evidence could be found for probable non-classical export of most of the remaining proteins.

Conclusions: Comparative analyses of the exoproteomes of two *C. pseudotuberculosis* strains, in addition to comparison with other experimentally determined corynebacterial exoproteomes, were helpful to gain novel insights into the contribution of the exported proteins in the virulence of this bacterium. The results presented here compose the most comprehensive coverage of the exoproteome of a corynebacterial species so far.

Background

Corynebacterium pseudotuberculosis is a facultative intracellular pathogen that belongs to the so-called CMN (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*) group, a distinct subgroup of the *Actinobacteria* that also includes other highly important bacterial pathogens, such as *Corynebacterium diphtheriae* and *Mycobacterium tuberculosis*. The most distinctive feature of these Gram-positive bacteria is the unique composition of the cell envelope, characterized by the presence of long

chain fatty acids, known as mycolic acids, on the surface of the cell [1,2].

The main recognizable disease caused by *C. pseudotuberculosis* is caseous lymphadenitis (CLA) in sheep and goats, though this bacterium can also infect several other hosts, including humans [1,3]. Typical manifestations of CLA in small ruminants include formation of abscesses in superficial and internal lymph nodes, and in visceral organs [3]. Despite the important economic losses caused by this disease to sheep and goat husbandry worldwide, no effective treatment exists, and the efficacy of the currently available vaccines and diagnostic methods is still controversial [4].

The search for *C. pseudotuberculosis* molecular determinants that contribute to CLA pathogenesis lead to the

* Correspondence: vasco@icb.ufmg.br
²Department of General Biology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Pacheco et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



SEROLOGICAL SECRETOME ANALYSIS OF CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS

Núbia Seyffert^{1,2}, Luis G.C. Pacheco^{1,2}, Wanderson S. Marques¹, Thiago L.P. Castro¹, Agenor V. Santos^{3,5}, Anderson Santos¹, John A. McCulloch^{1,5}, Maira R. Rodrigues¹, Simone G. Santos², Luiz M. Farias², Maria A.R. Carvalho², Adriano M.C. Pimenta³, Artur Silva⁵, Roberto Meyer⁴, Anderson Miyoshi¹, Vasco Azevedo¹

¹*Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte 31.270-901, Brazil.*

²*Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte 31.270-901, Brazil.*

³*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte 31.270-901, Brazil.*

⁴*Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia,
Salvador 40.110-902, Brazil.*

⁵*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará,
Belém 66.075-900, Brazil.*

**Corresponding author: Dr. Vasco Azevedo - vasco@icb.ufmg.br*

Keywords: C. pseudotuberculosis, caseous lymphadenitis, secretome