

**Expressão diferencial de proteínas de amostras
de *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* após
passagens sucessivas em novilhas.**

Ana Paula Reinato Stynen

**Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciência Animal.
Área: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Andrey Pereira Lage
Co-orientadores: Marcos Bryan Heinemann
Renato de Lima Santos**

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2009**

S938e

Stynen, Ana Paula Reinato, 1972-

Expressão diferencial de proteínas de amostras de *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* após passagens sucessivas em novilhas/ Ana Paula Reinato Stynen. – 2009.
52 p. : il.'

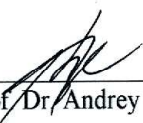
Orientador: Andrey Pereira Lage

Co-orientadores: Marcos Bryan Heinemann, Renato de Lima Santos
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. *Campylobacter fetus* – Teses. 3
Infecções por *Campylobacter* – Teses. 4. Proteínas – Teses. I. Lage,
Andrey Pereira. II. Heinemann, Marcos Bryan. III. Santos, Renato de Lima
. IV. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. V. Título.

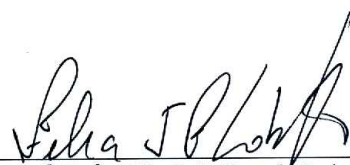
CDD – 636.089 693 6

Tese defendida e aprovada em 18 de fevereiro de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Dr. Andrey Pereira Lage


Dr.ª Aiesca Oliveira Pellegrin


Prof.ª Dr.ª Dulciene Maria de Magalhães Queiroz


Prof.ª Dr.ª Zélia Inês Portela Lobato


Dr.ª Ana Claudia Pinto Cottorello

*Às minhas filhas, Cleo e Sofia.
Sem as quais, meu mundo não teria razão.*

“Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante, do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo”.

Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

Ao Wim Stynen, companheiro de uma vida, que me apóia, incentiva e acredita no meu trabalho.

Aos meus pais, Carlos Alberto e Geruza Helena, por tudo que sou.

À minha querida irmã, Livea Helena, que foi meu braço direito e esquerdo em vários momentos dessa caminhada.

Aos meus irmãos, Carlos Henrique e Luiz Felipe e minhas cunhadas, Rosicler e Rinele por fazerem da nossa família uma verdade.

Ao Prof Andrey Pereira Lage, pela orientação.

A minha querida prima, Dr Ludmila Rodrigues Camargo, pela total colaboração, ensinamentos sobre eletroforese bi-dimensional, incentivas e acolhidas durante a realização deste trabalho.

A minha amiga Karina Leite Miranda Guimarães, por ser amiga no significado amplo da palavra amizade: sentimento fiel de afeição, apreço, estima ou ternura entre as pessoas.

A minha amiga Telma Maria Alves, por dividir comigo as alegrias e tristezas de momentos inesquecíveis que fazem parte da minha vida.

A minha amiga Ana Claudia Pinto Cottorello, por iniciar e incentivar este trabalho.

A Janete Chung, grande colaboradora deste trabalho, me ensinando com paciência e dedicação espectrometria de massa e eletroforese bi-dimensional.

Aos amigos do Lab: Rebeca Pauletti, Silvia Minharro Barbosa, Monalisa Sousa Moura Souto, Elaine Maria Seles Dorneles, Juliana Pinto da Silva Mol,

Giovanna Ivo Andrade, Thiago Magalhães Resende, por serem mais que companheiros de uma jornada.

Ao Prof Sergio Schenckman pela acolhida em seu laboratório, possibilitando a execução deste trabalho.

Ao Prof Marcos Bryan Heinemann e ao Prof Renato de Lima Santos pelas valiosas dicas durante o meu doutorado.

Ao Dr Pedro Moacir Mota e George Afonso V Caldeira do Ministério da Agricultura, pela liberação dos animais avaliados neste estudo.

Aos funcionários do MAPA que há anos vêm me ajudando no trabalho com os animais.

Ao CNPq e à Fapemig, pelo suporte financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte deste trabalho e fazem parte da minha história.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
LITERATURA CONSULTADA	
<i>Campylobacter fetus</i> subsp <i>venerealis</i>	13
Distribuição da Campilobacteriose Genital Bovina	13
Patogenia da Campilobacteriose Genital Bovina	14
Fatores de virulência	15
Estabelecimento da infecção	17
Quimiocinas e infecção microbiana	18
Proteoma	19
Análise Proteômica	20
Focalização isoelétrica – IEF (primeira dimensão)	20
SDS – PAGE (segunda dimensão)	21
Detecção de proteínas em géis	21
Espectrometria de massas	21
Técnicas de Ionização	22
Analísadores de massa	23
Sistemática de busca	24
MATERIAL E METODOS	24
Amostras e Condições de Cultivo	24
Ensaio de aderência de em células HeLa.	26
Cinética da expressão de IL-8 em células HeLa infectadas com amostras <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	27
Preparação das amostras, extração e solubilização das proteínas para.o gel bi-dimensional (2DE)	27
GEL BIDIMENSIONAL (2DE)	28
Focalização isoelétrica (primeira dimensão)	29
SDS – PAGE (segunda dimensão)	29
Coloração e visualização dos géis	29
Análise das imagens dos géis	29
Proteólise “in gel” e preparação das amostras para espectrometria de massa (MS)	30
Análise de Espectrometria de massa (MS)	30
Identificação das proteínas em banco de dados	31
RESULTADOS	31
Aderência em células HeLa	31
Cinética do acúmulo de IL-8 RNAm em células HELA infectadas por <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	32
Gel bi-dimensional de proteínas	32
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes básicos de um espectrômetro de massa	22
Figura 2	Esquema detalhado de um instrumento MALDI-TOF	23
Figura 3	Esquema detalhado do instrumento MALDI-TOF-TOF	24
Figura 4	Percentuais de aderência das amostras de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354T, P2 e P3 em células HeLa em função do tempo de incubação pós-infecção.....	32
Figura 5	Acumúculo de RNAm de IL-8 em células HeLa após infecção com amostras de <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354T, P2 e P3, em função do tempo pós-infecção. Antônio do Monte – MG	33
Figura 6	Detalhe de alguns spots selecionados nos géis, com suas respectivas demonstrações tridimensionais, que mostram aumento de expressão na amostra <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> P3 em relação à amostra parental <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354T	34
Figura 7	Detalhe de alguns spots selecionados nos géis, com suas respectivas demonstrações tridimensionais, que mostram aumento de expressão na amostra <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> P3 em relação à amostra parental <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354T	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteínas identificadas por espectrometria de massa que tiveram a expressão significativamente* AUMENTADA.....	36
Tabela 2	Proteínas identificadas por espectrometria de massa que tiveram a expressão significativamente* DIMINUIDA.....	37
Tabela 3	Proteínas identificadas por espectrometria de massa que não tiveram alteração estatisticamente significativa na expressão.....	38

RESUMO

A campilobacteriose genital bovina é uma enfermidade de caráter venéreo, que leva a infertilidade temporária e abortos esporádicos em bovinos. Por isso, tem grande importância em países como o Brasil, onde há grandes rebanhos que utilizam a monta natural. Com o objetivo de verificar se a passagem seriada em novilhas ativa proteínas que estão ligadas à patogênese da infecção e identificar proteínas diferencialmente expressas em amostras de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, foi feito o teste de aderência e indução de transcrição de interleucina-8 (IL-8) em células epiteliais infectadas bem como a identificação de proteínas por espectrometria de massa. Verificou-se que a passagem seriada de *C. fetus* subsp. *venerealis* em novilhas leva ao aumento gradual de aderência e induz a transcrição de IL-8 em células HeLa. Passagens seriadas do microorganismo “*in vivo*” levam ao aumento na expressão de proteínas como: *Purine Binding Chemotaxis (CheW)*, *Flagellar Hook associated*, *Possible Lipoprotein* e *Methyl accepting chemotaxis*, ligadas a aderência bacteriana, quimiotaxia bacteriana e motilidade importantes na colonização e no estabelecimento da infecção.

Palavras-chave: *Campylobacter fetus venerealis*, bovino, proteômica, fatores de virulência.

ABSTRACT

The bovine genital campylobacteriosis is a venereal disease, which leads to temporary infertility and sporadic abortion in cattle. So it has great importance in countries like Brazil, where large herds using natural service. In order to verify that the serial passage in heifers active proteins that are linked to the pathogenesis of infection and identify differentially expressed proteins in samples of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, has been tested for adhesion and induction of transcription of interleukin-8 (IL-8) in infected epithelial cells and identification of proteins by mass spectrometry. It was found that serial passage of *C. fetus* subsp. *venerealis* heifers gradually leads to increased adhesion and induces transcription of IL-8 in HeLa cells. Serial passages of the microorganism “*in vivo*” lead to increased expression of proteins such as Chemotaxis Purine Binding (CheW), Hook Associated scourge, Lipoprotein and Possible Accepting chemotaxis methyl, linked to the bacterial adherence, chemotaxis and motility important in bacterial colonization and the establishment infection.

Keywords: *Campylobacter fetus venerealis*, bovine, proteomics, virulence factors

1 - INTRODUÇÃO

A campilobacteriose genital bovina é uma doença infecciosa de caráter eminentemente venéreo causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, que se caracteriza, principalmente, por repetições de cio em intervalos aumentados e irregulares, em geral maiores do que 35 dias em decorrência de falhas na implantação embrionária, vacas vazias no final da estação de monta, com conseqüente queda na produção de bezerros nascidos e na produção de leite (Leite, 1977; Pellegrin, 1998). Além disto, a campilobacteriose genital bovina pode levar a endometrite secundária, cervicite, salpingite e infertilidade temporária ou permanente em algumas vacas (Lage e Leite, 2000), podendo ocasionar grande perda econômica devido aos problemas reprodutivos desencadeados (Leite, 1974; Dekeyser, 1984).

O estudo da interação parasita-hospedeiro nas diferentes infecções causadas por microrganismos é de fundamental importância para o conhecimento da patogenia da doença. Além disso, propicia informações para o possível desenvolvimento de quimioterápicos para o tratamento da enfermidade, de vacinas para melhorar os programas de controle e de testes diagnósticos. Na campilobacteriose genital bovina este tipo de estudo poderá propiciar avanço no conhecimento da

imunidade de mucosas no trato genital, que poderá contribuir para o conhecimento da patogenia de outras doenças nas quais a imunidade de mucosas seja importante.

Cabe ressaltar que a maior parte dos estudos sobre a patogênese da Campilobacteriose genital bovina diz respeito à manutenção da infecção no animal. Estudos sobre a interação entre *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e células do hospedeiro são muito escassos. Contudo, o conhecimento da interação parasita-hospedeiro é importante, uma vez que, a interação de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* com as células do hospedeiro é o primeiro passo para estabelecimento da infecção e provavelmente desempenha papel fundamental na patogênese da campilobacteriose genital bovina.

Portanto, considerando a hipótese de que a interação de células do hospedeiro com *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* resulta em alteração no perfil de expressão de proteínas estimulando o processo de adesão e produção de citocinas, o presente estudo foi desenvolvido para (i) verificar se a passagem seriada de amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* em novilhas ativa proteínas que estão ligadas à patogenia da infecção, utilizando testes de aderência e de indução de quimiocinas por células epiteliais infectadas, e (ii) identificar proteínas

diferencialmente expressas nestas amostras.

2 - LITERATURA CONSULTADA

2.1- *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*.

C. fetus subsp. *venerealis* são bastonetes Gram negativos, espiralados, em forma de vírgula ou "S". São microrganismos microaerófilos, necessitando de atmosfera rica em CO₂ (10%) e reduzida concentração de O₂ (5%) para seu crescimento. Possuem um ou dois flagelos polares, sendo sua motilidade melhor observada em microscopia de contraste de fase ou de campo escuro (Dekeyser, 1984).

A transmissão do *C. fetus* subsp. *venerealis* nas fêmeas é essencialmente venérea. Aproximadamente 100% das fêmeas se contaminam após a cópula com touro infectado. Sêmen proveniente de touro infectado e que não foi tratado com antibióticos também é fonte de infecção para as vacas (Lage e Leite, 2000). Os machos podem se infectar cobrindo uma fêmea infectada ou através de fômites e cama contaminada (Roberts, 1971). Em touros, o *C. fetus* subsp. *venerealis* infecta as criptas prepuciais, multiplicando-se nas glândulas penianas e na uretra distal, não provocando lesões, sendo o macho assintomático (Eaglesome e Garcia, 1992).

O *C. fetus* subsp. *venerealis* é o causador da campilobacteriose genital bovina, doença infecciosa de caráter venéreo, que ainda é de difícil controle em países com grandes rebanhos bovinos como o Brasil, onde o sistema de manejo dominante utiliza a monta natural. Por se tratar de uma doença reprodutiva com sinais clínicos pouco evidentes, quando a presença da doença é constatada no rebanho, as perdas econômicas já são grandes.

2.2- Distribuição da Campilobacteriose Genital Bovina.

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a campilobacteriose genital bovina está presente em alguns países, sendo considerado um problema em países como África do Sul, Argentina Austrália, Canadá, Estados Unidos da América, França, Inglaterra e Nova Zelândia, dentre outros (OIE, 2007).

Geralmente, áreas com grande número de rebanhos que utilizam monta natural apresentam alta prevalência de campilobacteriose genital bovina. Na Argentina, onde a campilobacteriose genital bovina é bastante estudada, vários levantamentos foram realizados, mostrando prevalências de 21% (Vilar e Spina, 1982) a 43% (Soto e Di Rocco, 1984).

No Brasil, a campilobacteriose genital bovina foi estudada durante a década de 1970 por meio da técnica de mucoaglutinação. As taxas de prevalência variaram de 12,5 a 27% (Pellegrin, 1999).

Em um estudo realizado no Pantanal Mato-grossense, foi encontrada uma prevalência de 52,3% de touros infectados. A prevalência de propriedades com animais infectados neste estudo foi de 89,5%, mostrando que a campilobacteriose genital bovina está amplamente disseminada nos rebanhos da região (Pellegrin et al., 2002).

A prevalência da infecção de touros de rebanhos de corte com mais de 500 animais foi estudada por Miranda (2005). Foram incluídos neste estudo os Estados onde se localizava a maior população de bovinos de corte do país: Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo e Tocantins. Dos 1191 animais testados de 120 propriedades, 224 foram positivos pela imunofluorescência direta, resultando em uma prevalência ponderada de 19,7%. A prevalência de rebanhos com campilobacteriose genital bovina encontrada neste estudo foi de 50,8%.

2.3 – Patogenia da Campilobacteriose Genital Bovina

A patogenia da campilobacteriose genital bovina envolve a colonização do trato

genital da fêmea pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*. O microrganismo é depositado na vagina durante a cópula, atravessa a cérvix e alcança o útero juntamente com os espermatozoides e, na maioria dos casos, a fertilização irá ocorrer independentemente da presença do patógeno. Bielanski *et al.* (1994) cultivaram embriões *in vitro* juntamente com o *C. fetus* subsp. *venerealis* e observaram que o desenvolvimento embrionário até à eclosão (8–10 dias) é pouco influenciado pela presença deste microrganismo. Entretanto, a inflamação causada no útero irá inibir a implantação embrionária ou causar a morte do embrião já implantado (Dekeyser, 1984). A inflamação se estende da vagina à mucosa do oviduto, incluindo a cérvix e endométrio.

Simon e McNutt, 1957 observaram que as alterações patológicas presentes no trato reprodutivo de fêmeas bovinas após infecção com *C. fetus* subsp. *venerealis* são salpingite e endometrite. Frank et al. (1962) observaram reação inflamatória moderada no útero de 8 de 12 fêmeas infectadas com este microrganismo, sendo o infiltrado predominantemente neutrofílico e linfocítico com localização periglandular. Não foram observadas alterações histológicas na vagina, cérvix e ovários dos animais infectados.

Dozsa *et al.* (1960) estudaram as alterações histológicas que ocorrem no útero de vacas

durante o período de infecção com *C. fetus* subsp. *venerealis*. Verificou-se que as alterações histológicas na mucosa uterina tiveram início após o 5º dia de infecção, ficando mais pronunciadas entre o 15º e o 20º dia e atingindo o pico entre 30 e 60 dias. As lesões observadas foram erosão do epitélio luminal com infiltração de polimorfonucleares e linfócitos, degeneração do epitélio glandular e congestão vascular. Outros estudos foram realizados para verificar a presença de infiltrados inflamatórios no trato genital de vacas infectadas com o *C. fetus* subsp. *venerealis* (Vandeplasseche *et al.*, 1963; Corbeil *et al.*, 1975) e obtiveram resultados semelhantes.

2.4 – Fatores de Virulência

Os estudos dos fatores de virulência de *C. fetus* têm sido realizados principalmente com amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* (Garcia e Brooks, 1993), porém, Garcia *et al.* (1995) demonstraram que os mesmos fatores de virulência ocorrem na campilobacteriose genital bovina causada pelo *C. fetus* subsp. *venerealis*.

O *C. fetus* persiste no hospedeiro porque possui um sistema eficiente de colonização, que é dependente de uma cápsula denominada camada S (“Superficial”), a qual possui arranjos de subunidades protéicas conhecidas como proteínas SAP (“Surface Array Proteins”). Estas proteínas,

representam 10% do total de proteínas celulares e podem ocorrer de múltiplas formas, com tamanhos moleculares variando de 90kDa a 149kDa (Dubreuil *et al.*, 1988, Pei *et al.*, 1988). A camada S recobre estruturas imunogênicas da bactéria, incluindo o lipopolissacarídeo (LPS), tornando-o inacessível às defesas do hospedeiro. A localização dessas proteínas na superfície bacteriana sugere sua importância na interação patógeno–hospedeiro (Garcia e Brooks, 1993).

A manutenção da camada S apresenta vantagens para o *C. fetus*, uma vez que a variação antigênica das proteínas de camada superficial protege contra a opsonização mediada por anticorpos e da fagocitose, sendo estes mecanismos evasivos que efetivamente facilitam a persistência do *C. fetus* no hospedeiro. Garcia *et al.* (1995) demonstraram que a colonização persistente de *C. fetus* na vagina de bovinos está associada não somente à variação antigênica das proteínas da camada S como também pela alta frequência que o evento ocorre. Além disso, a camada S é responsável pela resistência à ligação com o C3b, protegendo diretamente a bactéria das defesas mediadas pelo complemento e indiretamente tornando-a resistente à fagocitose (Dworkin, Blaser, 1997).

Mudanças na camada S da bactéria explicam a produção de componentes de

superfície com diferentes especificidades antigênicas, caracterizando o mecanismo de defesa do agente contra a resposta imunológica hospedeiro. Essas pequenas variações antigênicas das proteínas SAP também podem explicar o fenômeno observado em vacas portadoras, uma vez que o animal não tem condições imunológicas de responder prontamente a estas variações antigênicas, durante o curso da infecção (Garcia et al., 1993; Garcia et al., 1995, Thompson e Blaser, 2000).

Tu et al. (2005) relata que a deleção dos gene *sap*, que codifica estas proteínas, resulta em acentuada redução da virulência bacteriana. A alternância do promotor único entre as diversas cópias homólogas do gene *sap*, por recombinação, resulta em diferentes proteínas de superfície com altas massas moleculares com 100, 127 e 149 kDa (Wang et al., 1993; Boot e Pouwels, 1996). Estes eventos de recombinação produzem modificação em epítomos dominantes durante a persistência da bactéria no aparelho genital (Garcia, et al., 1995). Segundo Fujimoto et al. (1991) as proteínas de 100 e 149 kDa têm uma relação imunológica, a qual não é descrita para a proteína de 127 kDa. Logo, a variação nestes antígenos de superfície, permite ao *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* colonizar de forma crônica superfícies epiteliais do hospedeiro, independentemente dos sistemas naturais de defesa contra a infecção (Wang et al.,

1993; Garcia et al., 1995). Durante uma infecção, a imunidade local elimina os microrganismos lentamente, tornando o útero livre da infecção antes da cavidade vaginal (Corbeil et al., 1974; 2003). Os mecanismos relacionados às variações na expressão das proteínas de superfície em *Campylobacter fetus* têm sido objeto de experimentos em biologia molecular (Garcia et al., 1995; Dworking e Blaser, 1997; Ray et al., 2000), e são relevantes para o entendimento dos sistemas de variação antigênica deste microorganismo e o caráter crônico da infecção no hospedeiro e aspectos imunológicos da enfermidade produzida.

Os mecanismos relacionados as variações na expressão das proteínas de superfície em *Campylobacter fetus* têm sido objeto de experimentos em biologia molecular (Garcia et al., 1995, Dworking e Blaser, 1997; Ray et al., 2000), e são relevantes para o entendimento dos sistemas de variação antigênica deste microorganismo e o caráter crônico da infecção no hospedeiro.

Recombinação gênica que resulta em uma variação fenotípica ocorre em alta frequência dentro do gene *sapA*. Recombinação entre múltiplos homólogos de *sapA* são mediadas por regiões 5' conservadas, resultando em uma variação na expressão dos genes homólogos localizados *downstream* do único promotor *sapA* que pode ser transcrito, entretanto,

todos os homólogos sapA são silenciosamente transcritos (Tu et al., 2005). Com isso, segmentos de DNA contendo o promotor e as janelas de leitura das proteínas de superfície são rearranjadas dentro do genoma do *C.fetus* durante um único evento de inversão permitindo sua expressão (Dworkin et al, 1997). O fato de estes eventos serem conservativos é indicado pela retenção de todas as fitas mutadas apesar de várias sessões de seleção serem feitas, e também importantes pela presença de fitas com seqüências nucleotídeos praticamente idênticas em todas as amostras de *C. fetus* (Dworkin et al, 1995).

É importante ressaltar que não existem estudos que demonstram os mecanismos de virulência utilizados pelo *Campylobacter fetus* para estabelecimento da infecção no hospedeiro, os estudos até agora estão concentrados na persistência da infecção no hospedeiro.

2.6 - Estabelecimento da infecção

O processo de infecção é um fenômeno multifatorial que depende da interação de características pertencentes ao microrganismo e ao hospedeiro. A interação parasita-hospedeiro de *Campylobacter* sp. causadores de diarreias, principalmente do *C. jejuni*, foi muito estudada (Tenover et al., 1989; Devi et al., 1996, Hu et al., 2006). Fatores como motilidade do microrganismo, quimiotaxia, adesão e invasão celular e

produção de toxinas estão envolvidos na patogênia destes microrganismos (Wooldridge e Ketley, 1997).

Os fatores de virulência que podem estar envolvidos no processo de aderência e invasão celular foram estudados principalmente em *C. jejuni*. O flagelo e algumas adesinas são considerados de fundamental importância no início da interação destes microrganismos com as células (Wassenaar et al. 1991, Pei et al., 1998, Monteville et al., 2003).

Um dos primeiros passos para o estabelecimento de uma infecção é a ligação do microrganismo à célula do hospedeiro. Para alguns microrganismos esta ligação serve para fixá-lo ao epitélio e para outros é um pré-requisito para a invasão celular, onde o microrganismo estará protegido das defesas do hospedeiro. Após a ligação também se iniciam os processos de sinalização celular, que irão ativar o microrganismo e desencadear o processo de resposta imunológica do hospedeiro.

A capacidade de aderência e invasão de *Campylobacter* sp. foi avaliada em estudos realizados com linhagens celulares de origem humana e animal, sendo as mais utilizadas as provenientes dos tratos digestivo, respiratório e reprodutivo. Poucos estudos foram realizados em amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* (Graham, 2002; Rios,

2005) e de *C. fetus* subsp. *venerealis* (Cottorello, 2006).

Graham (2002) avaliou a capacidade de aderência e invasão de *C. fetus* subsp. *fetus* em diferentes linhagens celulares. Os resultados mostraram que a eficiência de aderência e invasão de *C. fetus* subsp. *fetus* foi maior na linhagem celular de origem humana INT 407 quando comparada com as outras linhagens testadas.

Rios (2005) avaliou o potencial de aderência, invasão de amostras de *C. fetus* isoladas no trato genital de bovinos em células HeLa. Entre as amostras de *C. fetus* subsp. *fetus* isoladas, 83% aderiram e nenhuma foi capaz de invadir as células HeLa..

Cottorello (2006) estudou aderência e invasibilidade de amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis*, isolada do trato genital de bovinos em células HeLa e INT407 e as amostras, foram incapazes de invadir as células destas linhagens.

No mesmo trabalho, Cottorello, (2006) testou o percentual de aderência da amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis* (NCTC 10354) e da amostra reisolada no muco cérvico-vaginal de bovinos após 7 dias de inoculação, denominada P1. A amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* P1 apresentou maior percentual de aderência que a amostra

parental. Demonstrando que existe uma diferença da amostra de referência mantida em laboratório para a amostra ativada, reisolada no trato genital de bovinos. Mecanismos de virulência necessários à colonização da mucosa do hospedeiro são ativados após passagem da amostra de *C. fetus* subsp *venerealis* no animal.

2.7 - Quimiocinas e infecções bacterinas

O processo inflamatório faz parte da resposta do hospedeiro a traumatismos diretos ou indiretos, incluindo trauma tecidual, câncer, infecções e doenças autoimunes. A resposta do hospedeiro a estas injúrias irá caracterizar uma reação inflamatória aguda ou crônica, dependendo da duração desta resposta (Kunkel et al., 1997).

Em uma inflamação, os agentes quimiotáticos atuam em conjunto sobre as células inflamatórias para produzir o efeito desejado em cada momento da infecção. Reações inflamatórias agudas causadas por bactérias normalmente induzem uma resposta celular com predominância de neutrófilos, enquanto reações crônicas caracterizam-se pela presença de linfócitos e macrófagos. Esta predominância de determinados tipos celulares em momentos diferentes da infecção se deve a especificidade de cada membro da família das citocinas em atrair subpopulações

distintas de células do sistema imunológica (Kunkel et al., 1997).

As células epiteliais exercem funções importantes na regulação da inflamação em resposta a antígenos bacterianos. Bactérias enteroinvasivas estimulam a produção de quimiocinas em células epiteliais intestinais (Eckman et al., 1993). Linhagens celulares epiteliais de diferentes origens já tiveram sua capacidade de produção de quimiocinas comprovada após infecção com microrganismos invasivos e não invasivos.

As quimiocinas possuem papel fundamental na ativação e recrutamento de células de defesa para o local da infecção. O estudo da expressão de algumas quimiocinas pela célula após a infecção fornece informações importantes sobre os mecanismos iniciais da resposta imune contra o patógeno.

Os estudos da produção de IL-8 induzida por bactérias do gênero *Campylobacter* foram realizados principalmente com o *C. jejuni* (Hichey et al., 2000; Al-Salloom et al., 2003; Jones et al., 2003). Hichey et al. (2000) estudaram a produção de IL-8 em células intestinais INT 407 infectadas com *C. jejuni*, concluindo que a produção de IL-8 pelas células aumentou após a infecção.

O único trabalho que estuda a produção de IL-8 em células HeLa infectadas por *C.fetus* subsp. *venerealis* foi realizado por Cottorello, (2006) e demonstra que o *C.*

fetus subsp. *venerealis* estimulou a expressão de IL-8 em células HeLa, indicando o envolvimento desta quimiocina na resposta imunológica inicial das células epiteliais do hospedeiro após contato com o patógeno e que a amostra ativada de *C. fetus* subsp. *venerealis* (P1) estimulou uma acumulação mais precoce e mais intensa de IL-8 em células HeLa do que a amostra parental NCTC 10354.

2.7 - Proteoma

O termo proteoma foi primeiramente descrito em 1995 e era definido como a caracterização em larga escala do conjunto total das proteínas das células, tecidos, ou organismos. O principal alvo da proteômica é obter uma visão integrada da biologia, estudando todas as proteínas da célula (Graves e Haystead, 2002). Por definição, proteoma é o conjunto de proteínas codificadas e expressas por um genoma, sob determinadas condições. A análise proteômica, definida como sendo o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar (quali e quantitativamente) um proteoma, trata-se de uma área interdisciplinar da ciência, a qual agrega principalmente química, biologia e informática (Tyers, 2003., Aebersold, 2003., Ong, 2005).

Tais estudos são bastante desafiadores em função da alta complexidade das amostras bem como das baixíssimas concentrações de determinadas proteínas, o que requer o

uso de técnicas analíticas extremamente sensíveis. Assim, a espectrometria de massas (MS) é a ferramenta ideal para aplicações proteômicas, fato este atribuído a sua capacidade de analisar proteínas e peptídeos com alta especificidade, precisão, velocidade e sensibilidade. Apesar da MS ser uma técnica centenária, sua aplicabilidade na área biológica tornou-se notória e praticamente imprescindível somente depois do desenvolvimento das técnicas brandas de ionização (ESI – Electrospray e MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), ocorridas no final dos anos 1980.

2.8 - Análise Proteômica

Em linhas gerais é possível descrever um estudo proteômico em seis etapas:

(i) as proteínas a serem analisadas devem ser primeiramente extraídas de lisados celulares ou tecidos e submetidas a etapas de separação (uni ou bidimensional); (ii) após a etapa de obtenção, o próximo passo será converter as proteínas isoladas em conjuntos de peptídeos. Isso é feito com a utilização de enzimas que promovem a clivagem das proteínas em pontos específicos; (iii) os peptídeos obtidos podem ser separados, ionizados e transferidos para o analisador de massa; (iv) Nesta etapa, o espectro de massas dos peptídeos oriundos da digestão enzimática é obtido. Este resultado indica a relação massa/carga que é igual à massa molecular (*Peptide mass fingerprint* – PMF); (v) os peptídeos

detectados durante o PMF são isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de um gás inerte. Os fragmentos formados são analisados pelos programas de busca para localizar as proteínas nos bancos de dados. Os mais comuns são o Sequest (Eng et al 1994) e o MASCOT (Perkins et al., 1999).

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-E), desenvolvida por O'Farrel (1975) e Klose (1975), é uma técnica de separação largamente utilizada para análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou amostras biológicas. Esta técnica promove a separação de proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Na segunda dimensão, eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) separam-se proteínas de acordo com suas massas moleculares relativas.

2.9 - Focalização Isoeletrica

Proteínas são moléculas anfóteras, ou seja podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou zero, dependendo de sua estrutura primária (dos aminoácidos que as compõem) e do pH do meio (Lefkovitz, 2003). Desta forma, em um gradiente de pH, sob a influência de um campo elétrico, as proteínas irão migrar para a posição do

gradiente na qual sua carga líquida é zero, focalizando-se neste ponto, onde o valor de pH é numericamente igual ao pI. O uso de anfólitos carreadores de gradiente de pH foi substituído por fitas com gradientes de pH imobilizados (*immobilized pH gradient* – IPG) (Righetti et al., 1999; Gorg et al., 1995, 2000). O uso das fitas IPG apresenta diversas vantagens em relação aos carreadores anfóliticos, pois permite uma comparação entre resultados de diferentes laboratórios, maior resolução e maior capacidade de volume (Righetti et al., 1999; Gorg et al., 1995, 2000).

2.10 – SDS PAGE (segunda dimensão)

Após a IEF, as proteínas são transferidas para a segunda dimensão, onde são separadas de acordo com suas massas moleculares relativas em um gel de poli(acrilamida) com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Os compostos usados para formar o gel são os monômeros de acrilamida e bis-acrilamida. O SDS é um tensoativo aniônico que, em meio aquoso, forma micelas compostas por 70-80 moléculas. SDS e proteínas formam complexos nos quais grandes quantidades de SDS associam-se às proteínas. Desta forma, o complexo tem carga líquida altamente negativa fazendo com que a separação eletroforética no gel dependa da massa molecular da proteína. Proteínas com massa molecular menor atravessam o gel mais rapidamente que proteínas com massa molecular maior.

2.11 – Detecção de proteínas em géis

Os métodos mais comumente empregados são a coloração com prata e corantes orgânicos, tais como o Azul de Comassie (Laemmli, 1970). Os corantes orgânicos constituem o método mais simples de detecção de proteínas, porém a sensibilidade da detecção varia de coloração para coloração bem como de proteína para proteína. Os mais usados são o Comassie Blue G-250 e R-250. De modo geral, a coloração por Azul de Comassie é suficientemente sensível para detectar 38 ng de uma proteína genérica em um *spot* no gel (Hammes, 2002).

2.12- Espectrometria de massas

De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massa, um detector e um sistema de aquisição de dados. (Figura 1) Na fonte de ionização, as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas, os íons formados, são separados de acordo com suas relações massa/carga e posteriormente detectados. Outro avanço relevante que contribuiu para o desenvolvimento da espectrometria de massas (MS) foi a conjugação de analisadores de massa em seqüência (MS/MS). Tal arranjo aumentou muito o poder de resolução e a sensibilidade da técnica, tornando-a praticamente obrigatória

nas análises de moléculas biológicas. Com esta técnica é possível obter informações sobre a estrutura da molécula original, permitindo determinar, por exemplo, a

seqüência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração de algum resíduo de aminoácido (Steen, 2004).

Componentes dos espectrômetros de massa usados na análise de proteínas e peptídeos



Figura 1. Componentes básicos de um espectrômetro de massa.

2.13 – Técnicas de Ionização

Os dois métodos mais comuns são a ionização por eletropulverização (ESI) e ionização por desorção a laser auxiliado por matriz (MALDI). Em ambos os métodos, os peptídeos são convertidos a íons pela adição ou perda de um ou mais prótons (Graves e Haystead, 2002).

Na ionização tipo MALDI, a solução contendo a amostra é misturada a uma solução super saturada de matriz orgânica, a qual absorve fortemente radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda. Quimicamente, as matrizes são pequenas moléculas orgânicas com absorbância no comprimento de onda do laser empregado. Usualmente são utilizadas matrizes de α -ciano-4-

hidroxicinâmico (α -ciano), ácido dihidrobenzóico (DHB), ou ácido 3,5-dimetoxi-cinâmico (ácido sinapínico). As matrizes diferem na quantidade de energia que cedem as biomoléculas durante a desorção/ionização e, portanto, diminuem a degradação unimolecular do analito. A natureza do processo da ionização por MALDI é ainda desconhecida e a intensidade do sinal depende da incorporação dos peptídeos nos cristais da matriz, na sua probabilidade de capturar ou reter o próton durante o processo de desorção, e em outros fatores como os efeitos de supressão nas misturas de peptídeos (Mann, Hendrickson e Pandey, 2001). A ionização por MALDI fornece principalmente um único íon carregado, excelente característica para análise de

misturas biológicas como hidrolisados protéicos.

2.14 – Analisadores de massa

Em relação aos analisadores de massa, existem diversos tipos com diferentes princípios, vantagens e desvantagens de acordo com a aplicação pretendida.

Os analisadores tipo TOF (*Time of Flight*) (Figura 2) são os mais empregados em associação com MALDI e, por princípio, os mais simples. Eles baseiam-se na separação dos íons de diferentes massa/carga, porém, com a mesma quantidade de energia cinética. Após

dessorvidos da matriz, os íons são acelerados em direção ao detector através de um tubo de voo, mantido sob alto vácuo. Assim, o tempo necessário para atingir o detector é proporcional a tensão aplicada e a relação massa/carga dos íons.

Analisadores TOF-TOF são instrumentos híbridos que integram a ionização tipo MALDI, a possibilidade de fragmentação de um íon selecionado por colisão com um gás inerte (CID – *Collision Induced Dissociation*) e análise dos íons/fragmentos usando um TOF. A Figura 3 representa um esquema detalhado do instrumento MALDI-TOF-TOF.

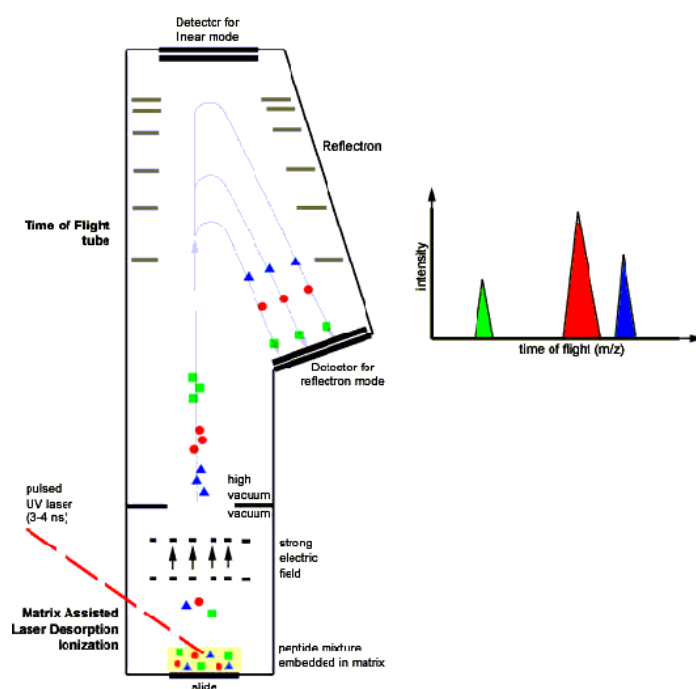


Figura 2. Esquema detalhado de um instrumento MALDI-TOF.

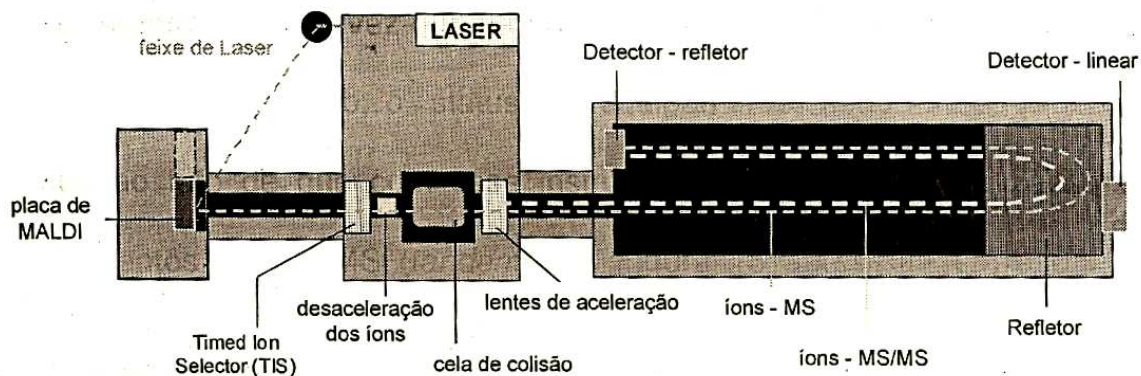


Figura 3. Esquema detalhado do instrumento MALDI-TOF-TOF.

2.14 - Sistemática de busca

Os softwares de buscas mais comumente empregados para a identificação de proteínas em bancos de dados a partir de dados de MS são o Sequest (Eng, 1994) e o MASCOT (Perkins, 1999). Ambos correlacionam espectros de massa de fragmentação de peptídeos com sequência de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados (Chamrad, 2004; Elias, 2005). Além disto, estes softwares também têm a capacidade de usar seqüências de nucleotídeos para fazer tal correlação. Para tal, eles primeiramente simulam as seqüências primárias das proteínas correspondentes àquelas seqüências de nucleotídeos encontradas nos bancos de genes, com base no código genético universal; posteriormente eles simulam a fragmentação destas seqüências primárias. De uma forma geral, estes programas têm

como objetivo encontrar a seqüência de aminoácidos, em um determinado banco de dados, que melhor descreve os íons fragmentados encontrados em um espectro (Perkins, 1999).

O objetivo deste trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas entre amostras de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* antes e após inoculação experimental em novilhas.

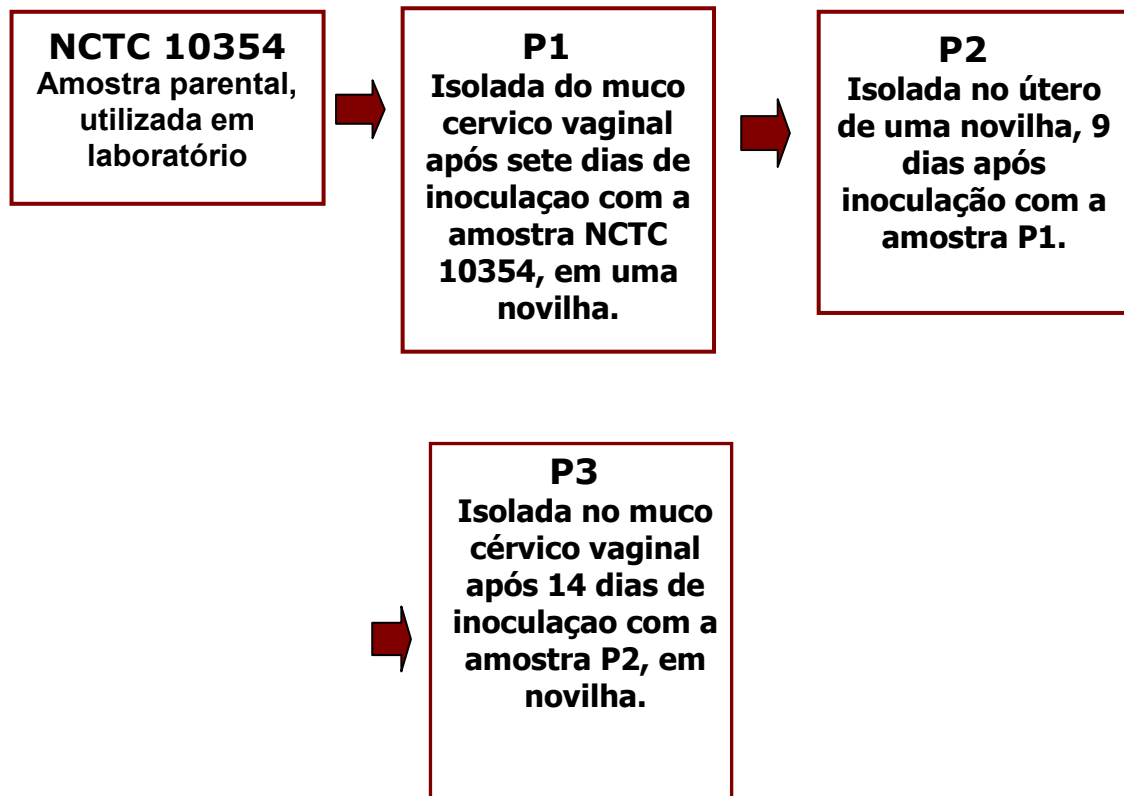
3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Amostras e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizadas as amostras *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, a amostra P2 e a amostra P3. As amostras P2 e P3 foram isoladas após infecção experimental por via vaginal de novilhas virgens. A amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T foi inoculada em

novilha virgem e, após sete dias de infecção, foi isolada do muco cérvico-vaginal do animal, a amostra denominada P1. A amostra P1 foi então inoculada na vagina de outra novilha virgem, que após nove dias de

infecção foi isolada do útero e a amostra denominada P2. Da inoculação da amostra P2 em outra novilha virgem foi possível o isolamento, a partir do muco cérvico-vaginal duas semanas pós-infecção, da amostra P3.



Toda a experimentação animal foi realizada seguindo as boas práticas de manipulação de animais (ScVC, 1997; AVMA, 2007) e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA–UFMG) sob protocolo nº 085/04.

As amostras foram cultivadas em ágar infuso de cérebro e coração (BHI) (Difco, EUA), acrescido de 10% de sangue equino, por 48h a 37°C em atmosfera de microaerofilia. A identificação das amostras reisoladas das novilhas infectadas foi realizada por testes bioquímicos de rotina (Vandamme, 2000) e por multiplex PCR de acordo com o protocolo relatado por Hum et

al.(1997) usando um conjunto de primers específicos para *C. fetus* (MG3F 5`GGTAGC AGC CGC TGCTAA GAT-3; MG4R 5`TAG CTA CAA CAA CGA TAA CT-3`), e *C.subsp. venerealis* (VenSF 5` AGT CTT AGC CGA TTG TGC TAT CAT T-3`; VenSR5` GCT GAG TTT ACA ATA ATA AGA GCT T-3). O DNA extraído pela guanidina foi misturado com 48 ml de PCR mix (200 mM de dNTPs, 10_ tampão de PCR contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 5 U de Taq DNA polimerase (Phoentria) e 30 pmol de primers (Life Technologies). A mistura foi submetida a uma etapa de desnaturação a 95°C por 3 min e 30 ciclos de 1 min a 95°C, 30s a 58°C e 30s a 72°C. e extensão a 72°C por 2 min. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até o uso e, salvo a amostra de referência, não tiveram mais que três passagens *in vitro* antes da realização dos testes.

3.2 – Ensaio de aderência em células HeLa

Foi estudada a capacidade de aderência das amostras em células da linhagem HeLa (*American Type Culture Collection – CCL2*), proveniente de carcinoma cervical humano. As células foram mantidas em meio mínimo essencial - MEM (Gibco, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, *Invitrogen*, EUA) em estufa à 37°C e a multiplicidade de infecção (MOI) utilizada foi de 500 bactérias / célula (Cottorello, 2006).

O ensaio com gentamicina foi realizado segundo o protocolo de Konkel e Joens (1989). As células HeLa foram repicadas em placas de 48 poços (Corning Incorporation - EUA) ($2,0 \times 10^5$ bactérias/poço) em um volume de 550µL em MEM (GIBCO – EUA) sem antibiótico + 5% SFB (GIBCO – EUA). Após 18 h de incubação a 37°C em 5% CO₂, a monocamada foi lavada com PBS e infectada com $1,0 \times 10^8$ bactérias em um volume de 140µL de cada amostra. Em seguida a monocamada foi incubada por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min a 37°C em 5% CO₂. Após a incubação a monocamada foi lavada dez vezes com PBS (0,01M PO₄, 0,15M NaCl, pH 7,4) para remoção das bactérias não aderentes. Em seguida, foram acrescentados 140µL/poço de MEM + 5% SFB com e sem 250µL/mL de gentamicina, para cada amostra bacteriana e as monocamadas foram reincubadas por 3h à 37° C em 5% CO₂. Após a incubação as células foram lavadas e lisadas com Triton X-100 (LKB Bromma - Suécia) a 0,1% por 10 min e o número de bactérias nos poços com e sem gentamicina foi determinado pelo *drop counting method* (Miles e Misra, 1938). Para cada experimento, foram realizados no mínimo dois testes por amostra e todos os testes foram realizados em duplicata.

As percentagens de aderência foram calculadas segundo Tay et al. (1996). A percentagem de aderência de cada amostra foi calculada utilizando as contagens

bacterianas do inóculo e dos poços sem gentamicina (% de aderência = [(número de bactérias intracelulares + bactérias aderentes) / número de bactérias do inóculo] x 100).

Para a análise estatística foi feita a transformação logarítmica (-log (X, 10)) dos dados de percentagem e contagem bacteriana e realizada a análise de variância. O teste de Duncan (Sampaio, 1998) foi utilizado para comparação das médias no experimento de cinética de aderência.

3.3 - Cinética da transcrição de IL-8 em células HeLa infectadas com amostras *C. fetus* subsp. *venerealis*

As amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, P2 e P3 foram utilizadas para infectar as células epiteliais segundo Cottorello (2006).

As células HeLa foram semeadas em placas de 6 poços (4,5x10⁵/poço) e incubadas a 37°C com 5% CO₂ por 18 horas. As células foram então inoculadas com suspensão de cada amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis*, na multiplicidade de infecção de 500 bactérias/célula e incubadas por 30 min, 2 h, 8 h, 12 h e 18 h.

Após cada tempo de incubação foi realizada a extração de RNA utilizando o Trizol Reagent[®] (Invitrogen-EUA) seguindo as orientações do fabricante. A obtenção do

cDNA foi realizada utilizando o Kit Reverse Transcription System (*Promega* -EUA). A determinação dos níveis de expressão de IL-8 foi realizada por RT – PCR em tempo real, utilizando-se SYBR Green (*Invitrogen* – EUA) como fluorocromo e o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*, EUA). Os parâmetros de reação utilizados foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Os resultados foram analisados utilizando o método comparativo de Cts (Livak e Schmittgen, 2001). A especificidade de amplificação foi verificada pela curva de dissociação ao final da reação de PCR (Giulietti et al., 2001). Os iniciadores utilizados foram específicos para IL-8 (IL-8F- 5'CTT GGC AGC CTT CCT GAT TT – 3', IL-8R- 5' TCA AAA ACT TCT CCA CAA CC 3' – número de acesso no GenBank: BC013615), descritos por Cottorello (2006).

Os experimentos foram realizados em duplicata. Os resultados obtidos nos vários grupos foram comparados quantitativamente após normalização baseada na expressão de GAPDH humano. Foi realizada a análise de variância utilizando-se o Sistema para Análises Estatísticas - SAEG[®] (Funarbe, Brasil) e as médias obtidas em cada tempo foram comparadas utilizando-se o teste de Duncan. (Sampaio, 1998)

3.4 - Preparação das amostras, extração e solubilização das proteínas para o gel bi-dimensional (2DE)

As amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* foram ressuspensas em tampão PBS, pH 7,4, centrifugadas a 2.000 g por 15 min e o sedimento das amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, P2 e P3, contendo 1×10^8 UFC, foram ressuspensos em 1,0 mL do reagente *Trizol*® (*Invitrogen*, EUA). Após serem homogeneizadas, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente (TA) por 5 min para permitir a completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Então, foram adicionados às amostras 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Os homogeneizados foram agitados e centrifugados por 10 min a 12.000 x g. Após a centrifugação a mistura foi separada em duas fases, fenólica e aquosa. A fase aquosa foi removida e descartada. Então, foram adicionados à fase fenólica 300 µL de etanol (Merck, Alemanha) para a precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 1,5 ml de isopropanol (Merck, Alemanha). As amostras ficaram a temperatura ambiente por 10 minutos para a precipitação das proteínas e então foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min.

Após essa etapa, o precipitado de proteínas foi lavado três vezes com 2,0 mL de uma solução contendo 0,3 M de hidrócloro de guanidina em 95% etanol (Merck, Alemanha) com centrifugação de 7500 x g por 5 min e

deixados a temperatura ambiente na bancada por 20 min entre cada centrifugação. Os precipitados dessa etapa foram homogeneizados em 2,0 mL de etanol e centrifugados novamente a 7500 x g por 5 min. Uma vez finalizado o processo de extração, a quantidade total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em função da complexidade e volume de análises, o estudo proteômico foi limitado às amostras parental e P3, por representarem o extremo de adaptação às condições *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Utilizou-se 1mg de proteínas por gel.

Os precipitados de proteínas foram então solubilizados em 250 µL de tampão de reidratação contendo 2,0 M de tiouréia (*Sigma-Aldrich*, Alemanha), 7,0 M uréia (*GE Healthcare*, Inglaterra), 2% de 3 - {(3-Colamidopropil) dimetilamônio}-1-propanosulfonato (CHAPS) (*GE Healthcare*, Inglaterra), 100 µL de inibidor de protease (*Complete EDTA free*, *Invitrogen*, EUA) e 2% tampão gradientes imobilizados de pH (IPG pH 3 a 11) (*GE Healthcare*, Inglaterra). Após isso as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos onde foram acrescidos de 10 µL de azul de bromofenol a 2%.

3.5 - Gel bidimensional (2DE)

O gel bidimensional de proteínas foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Pau sob a supervisão do Prof. Dr. Sérgio Schenkman.

3.5.1 - Focalização isoeétrica (primeira dimensão)

Para a focalização isoeétrica das proteínas, utilizamos fitas com anfólitos de pH variando de 3 a 11, (IPG strips, de 18 cm, não linear, (*GE Healthcare*, Inglaterra). As amostras, contendo 1,0 mg de proteínas ressuspensas em tampão de reidratação, foram então incubadas com as fitas em um aparato de reidratação (Immobiline DryStrip ReswellingTray, *GE Healthcare*, Inglaterra) durante aproximadamente 18 h e submetidas a focalização isoeétrica no sistema Multiphor II (*GE Healthcare*, Inglaterra), Usando a configuração para a fonte (EPS 3501 XL, *GE Heathcare*) fornecida pelo fabricante.

3.5.2 - SDS – PAGE (segunda dimensão)

Após a focalização, a separação de segunda dimensão foi realizada em um aparato de eletroforese vertical. As tiras foram colocadas em 10 mL de solução de equilíbrio 8 M uréia (*GE Healthcare*, Inglaterra), 2% Triton X-100 (*GE Healthcare*, Inglaterra), 0,002% azul de bromofenol (*GE Healthcare*, Inglaterra) contendo 10 mg/mL de ditiotreitrol (DTT - *GE Healthcare*, Inglaterra) por 15 min. e mantidas na

mesma solução de equilíbrio contendo 25 mg/mL de iodocetamida (*GE Healthcare*, Inglaterra) por mais 15 min. A tira foi então colocada sobre um gel de 12,5% de poli(acrilamida contendo SDS (Dodecil Sulfato de Sódio, Invitrogen, EUA). Para a imobilização da tira foi utilizada uma solução de agarose (*Invitrogen*, EUA) a 0,5% contendo 0,002% de azul de bromofenol. Foi utilizado o marcador de massa molecular BenchMark® Protein Lader (*Invitrogen*, EUA). A corrida eletroforética foi realizada a 30mA por gel, no equipamento Protean II (Bio-Rad – EUA)

3.5.3 - Coloração e leitura dos géis

Para a coloração dos géis, foi utilizado o corante de Comassie Blue Coloidal G-250 (*GE Healthcare*, Inglaterra), segundo protocolo de Candiano, et al. (2004). Após coloração os géis foram fotografados em sistema de documentação fotográfica digital.

3.5.4 - Análise das imagens dos géis

As imagens foram analisadas no programa ImageMaster™ 2D Platinum (version 6.0, *GE Healthcare*, Inglaterra) por uma combinação de detecção automática dos *spots*, feita pelo programa, e detecção manual.

Os *spots* com aumento ou diminuição de expressão pela passagem da amostra parental em novilha foram identificados pela comparação dos perfis protéicos após a

resolução das diferentes amostras pelo gel bidimensional.

Para determinar a reprodutibilidade do experimento, os géis foram feitos em triplicata. Uma vez que os spots foram detectados, o programa automaticamente computa a quantidade de proteína presente em cada *spot*.

O *ImageMaster* adicionalmente calcula a intensidade relativa (% intensidade: calibração da intensidade do spot "S" no gel contendo n spots) e o volume relativo (% volume: volume do spot "S" no gel contendo n spots) para cada spot. Esses são valores normalizados que são relativamente independente das variações irrelevância entre géis, particularmente causada pela variação das condições experimentais. Pela definição:

% Intensidade:

$$\%Intensity = \frac{Intensity}{\sum_{S=1}^n Intensity_S} \times 100,$$

% Volume:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{S=1}^n Vol_S} \times 100,$$

Pelo programa foram estimados os pontos isoeletricos, as massas moleculares e a quantidade relativa de cada proteína. Para a determinação da quantidade relativa de cada spot foi usado o método de normalização do volume.

3.5.5 - Proteólise "in gel" e preparação das amostras para espectrometria de massa (MS)

Os *spots* selecionados nos géis foram cortados em pequenos pedaços de aproximadamente 1,0 mm x 1,0 mm x 1,00 utilizando um bisturi estéril. O primeiro passo após o corte dos *spots* selecionados foi a descoloração do gel com 150 µL de uma solução 50 mM de bicarbonato de amônio (NH₄CO₃) (Synth, Brasil) e 50% de acetonitrila (Mallinckrodt, EUA), o processo foi repetido até que gel estivesse completamente descorado. Após esta etapa *spots* cortados foram desidratados com 100 µL de acetonitrila (Mallinckrodt, EUA). Para rehidratação dos *spots* cortados e digestão das proteínas, esses foram incubados por 16 horas à 37°C em uma solução 2 mM de bicarbonato de amônio (NH₄CO₃) (Synth, Brasil) com tripsina (Promega, EUA) a 20 µg/mL. Para extração dos peptídeos o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 25 µL de uma solução de acetonitrila a 60% (Mallinckrodt, EUA) e ácido trifluoracético a 1% (TFA - Mallinckrodt, EUA). O volume foi então reduzido para 5,0 µL em microcentrífuga com vácuo.

Com as médias dos volumes de cada spot calculadas pelo programa, foi feito o teste t de student (Sampaio, 1995)

3.5.6 - Análise de Espectrometria de massa (MS)

Para analisar as amostras no espectrômetro de massa utilizamos a matriz ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico (CHCA), solubilizada em uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) a 1% (Mallinckrodt, EUA) em acetonitrila (Mallinckrodt, EUA). Em um tubo de microcentrífuga foram misturados 1,0 μ L da solução de CHCA e 1,0 μ L da amostra, sendo 0,5 μ L da mistura colocada em cada pocinho da placa. O equipamento foi operado no modo positivo com o refletor ativado. Para essas análises foi utilizado um espectrômetro de massa do tipo quadrupolo 'ion-trap' QToF™ 2 Micromass (Waters, EUA). O QToF é controlado pelo software da Micromass Mass Lynx™, versão 3.5 (Waters, EUA). Estas análises foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), do Ministério da Ciência e Tecnologia, em Campinas –SP.

3.5.7 - Identificação das proteínas em banco de dados

Toda a informação adquirida para cada *spot*, ou seja, as relações massa/carga e intensidade dos picos obtidos no espectro bem como as razões massa/carga e intensidades dos picos referentes a cada um dos cinco espectros de MS/MS, foi compilada em um arquivo texto. Esse arquivo foi usado pelo MASCOT (Matrix Science, EUA) (<http://www.matrixscience.com>), para realizar a busca nos bancos de dados. Uma vez concluída a busca de acordo com a sistemática do programa, o MASCOT

informa o resultado, Usando para isso um gráfico de barras no qual existe um valor tido como limite. Escores abaixo deste valor indicam eventos randômicos, ou seja, sem valor estatístico. Por outro lado, se o escore atribuído para uma determinada proteína exceder o valor limite a chance de identificação gerada ser um evento randômico é de 5% e quanto maior esse valor maior a probabilidade da identificação estar correta.

Para a busca, foram utilizados os bancos de dados de proteínas de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* depositados no NCBI (National Center of Biotechnology Information, EUA). Ainda não existe um banco de dados de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, e o banco de dados de proteínas de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* não está totalmente depositado no banco de dados.

4 - RESULTADOS

4.1 - Aderência em células HeLa

Os percentuais de aderência em células HeLa das amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, P2 e P3 estão esquematizados na Figura 4. As amostras mostraram uma cinética de aderência semelhante. No entanto, a amostra P3 apresentou valores percentuais de aderência superiores aos apresentados pela amostra parental NCTC 10354^T na maioria dos tempos testados.

As amostras estudadas mostraram índices de aderência nas células já aos 30 min de incubação. Neste tempo, a diferença da amostra de referência para P3 foi de 10000 vezes. Para as amostras *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354, P3 e P2, os maiores percentuais de aderência foram obtidos com 180 e 150 min de incubação das bactérias com as células. As três amostras apresentaram um aumento no

percentual de aderência quando o tempo de incubação aumentou de 60 min para 90 min e o percentual máximo de aderência foi alcançado com 180 min de incubação. Em todos os tempos testados as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 e P2 mantiveram índices de percentuais significativamente superiores aos amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T.

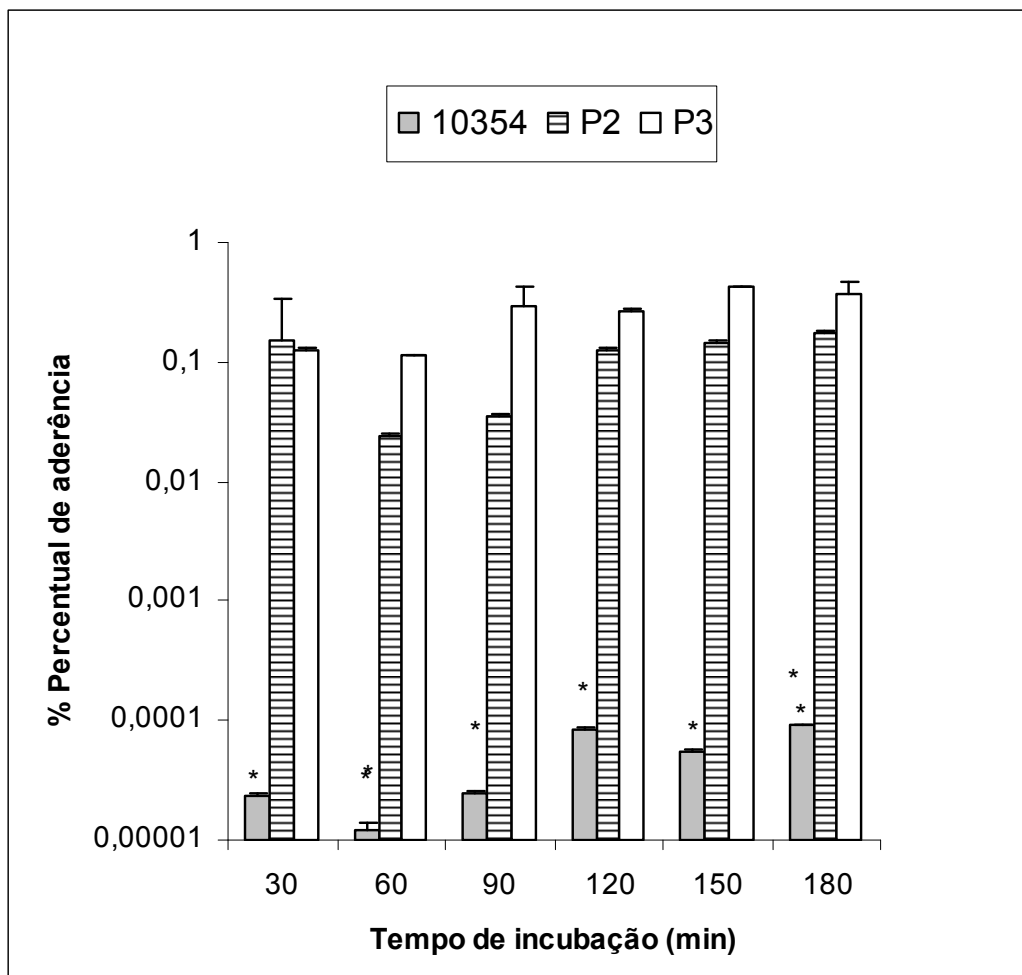


Figura 4 - Percentuais de aderência das amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, P2 e P3 em células HeLa em função do tempo de incubação pós-infecção.

4.2 - Cinética do acúmulo de IL-8 RNAm em células HELA infectadas por *C. fetus* subsp. *venerealis*

A variação do acúmulo de IL-8 em células HeLa infectadas com as amostras *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, P2 e P3 está representada na Figura 5. As três amostras seguem o mesmo padrão de acúmulo de IL-8 RNAm, com produção a

partir dos 30 min e com pico às 12 h. As células HeLa sem infecção apresentaram, em todos os tempos, uma acumulação basal de RNAm de IL-8. Entretanto, o acúmulo de IL-8 RNAm nas células HeLa infectadas com as amostras *C. fetus* subsp. *venerealis* P2 e P3 foi desde o início superior ao acúmulo nas células infectadas por *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T.

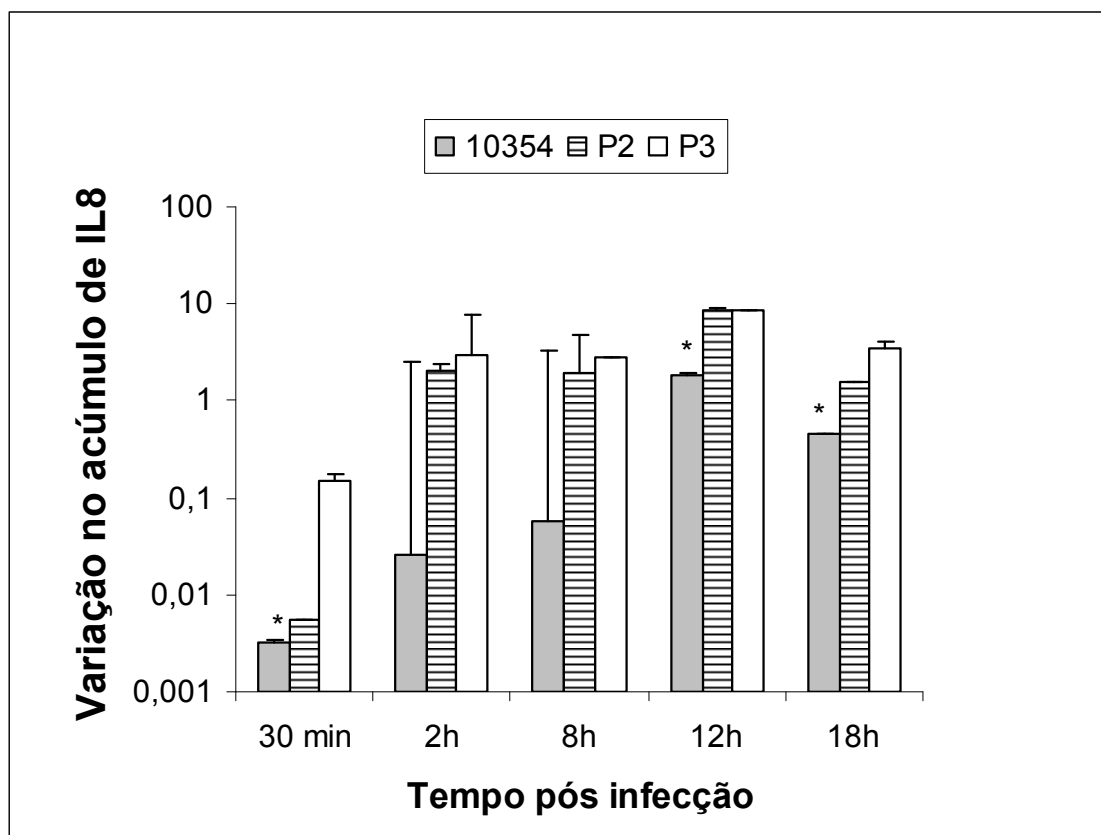


Figura 5: Acúmulo de RNAm de IL-8 em células HeLa após infecção com amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T, P2 e P3, em função do tempo pós-infecção.

*=diferença significativa

4.3 - Gel bi-dimensional de proteínas

Para a análise proteômica das amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T e P3, foram feitas triplicatas dos géis para

confirmar a reprodutibilidade dos experimentos. Todos os géis analisados apresentaram o mesmo perfil eletroforético, confirmando a reprodutibilidade do

experimento A Figura 6 é representativa destas triplicatas e mostra o perfil protéico da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC

10354^T e da amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3.

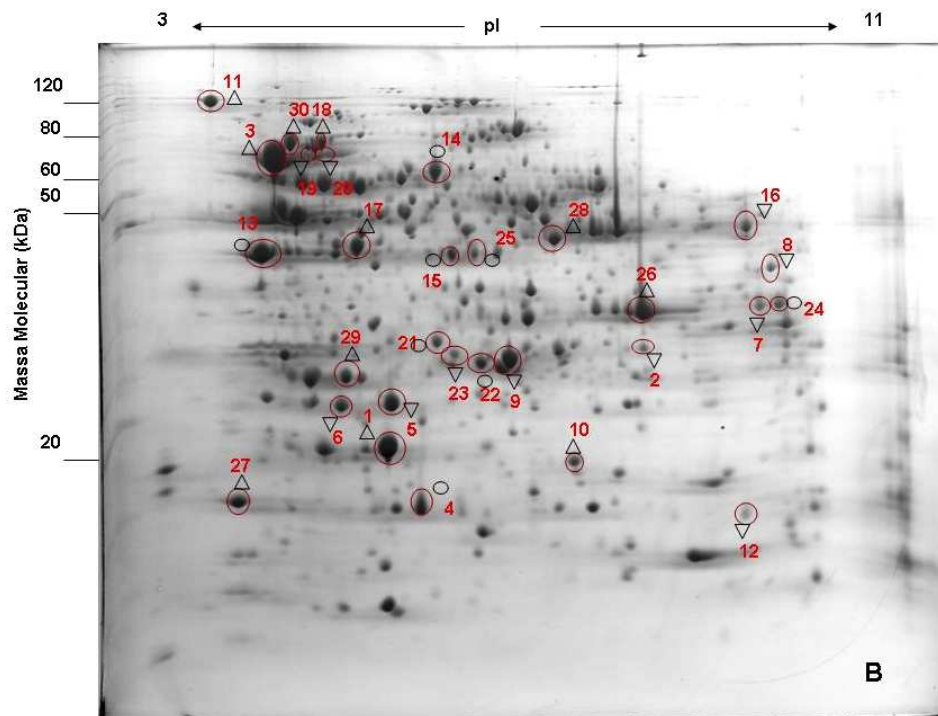
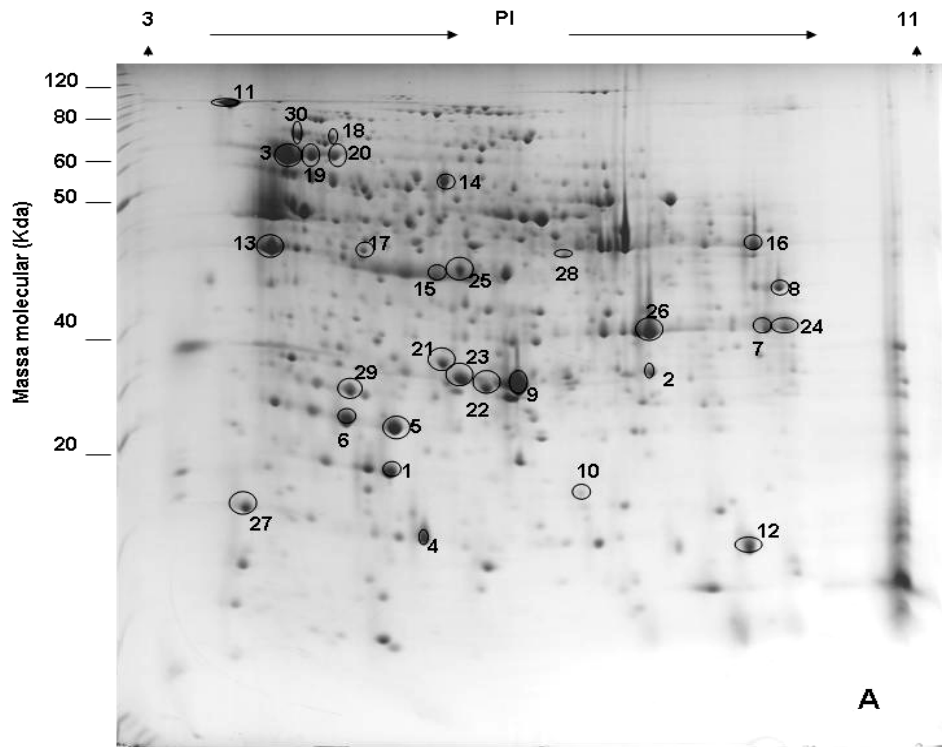


Figura 6 – Diferenças na expressão protéica entre as amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 (A) e P3 (B). Gel de eletroforese bidimensional de poliacrilamida a 12,5%, 18 cm, pH 3-11, utilizando 1 mg de proteína de cada amostra, corado pelo azul de Comassie. Os spots circulado em vermelho foram identificados pelo MASCOT após serem submetidos a análise de espectrometria de massa por Maldi- Tof-Tof . As formas ▲, ▼, ○, indicam, respectivamente, aumento, diminuição e sem alteração significativa na expressão entre a amostra NCTC 10354 e P3.

Após análise dos géis, foram recortados os spots que demonstraram diferença visual e densitométrica na expressão (aumento ou redução) entre as amostras *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354 e P3 (Figura 7). Os spots foram submetidos à análise por espectrometria de massa por Maldi TOF-TOF. A Figura 6 mostra os spots recortados

que após a espectrometria de massa foram identificados utilizando o software de busca Mascot (Matrix Science, EUA). Dentre os 90 spots selecionados pela análise, 30 deles (Figura 6) apresentaram scores superiores aos valores limites e por consequência foram identificados sem erros

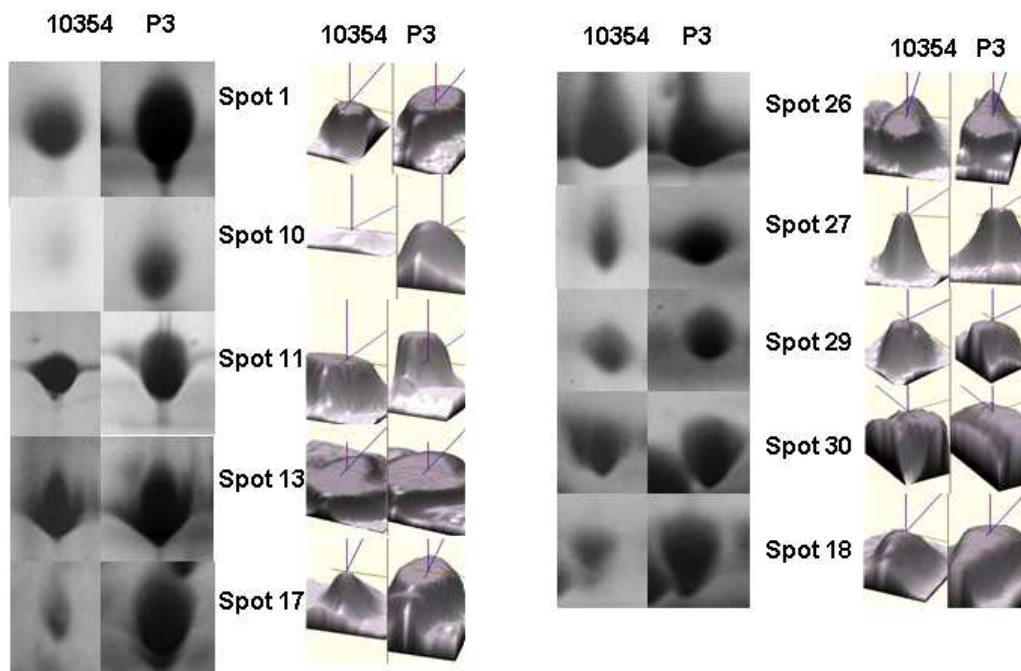


Figura 7 – Detalhe de alguns spots selecionados nos géis, com suas respectivas demonstrações tridimensionais, que mostram aumento de expressão na amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 em relação à amostra parental *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T.

A análise dos espectros resultou na identificação de 12 proteínas que apresentaram aumento significativo de expressão ($P < 0,05$) (Tabela 1), 12 proteínas que apresentaram redução significativa de expressão ($P < 0,05$) (Tabela 2) e 7 proteínas que não tiveram alteração significativa de expressão (Tabela 3) na amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 quando comparada à

amostra parental *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T. As proteínas identificadas foram agrupadas por categorias a fim de auxiliar na interpretação, sendo que a variação na expressão, o número de acesso no GenBank, os pontos isoelétricos e as massas moleculares são descritos nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Proteínas identificadas por MALDI – TOF significativamente aumentadas na amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 em relação à amostra parental *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T.

Spot ¹	Proteína	Variação ²	GenBank ³	MM ⁴	pI ⁵	p ⁶
Metabolismo						
1	Thiol Peroxidase	2,05	gi 118475243	20	5,57	0,001
	Transmembrane eflux					0,002
11	protein	1,80	gi 118474846	72	3,64	
30	Elongation factor G	1,55	gi 118475753	62	4,36	0,02
Adesão e Motilidade						
10	Purine Binding Chemotaxis	2,11	gi 118474195	19	7,44	0,00001
13	Flagelar Hook associated	2,04	Q5HVL8_CAMJR	41	4,23	0,002
17	Possible Lipoprotein	5,76	gi 148926772	43	5,24	0,002
	Methyl accepting					0,0009
26	chemotaxis	1,62	gi 118475178	34	8,12	
Stress celular						
18	Chaperona HTPg 90Kd	2,74	gi 118475345	62	4,87	0,00001
29	Alkyl hidroperoxidase	1,89	gi 118475037	27	5,13	0,00004
Ligação e Transporte						
27	Iron sulfur cluster binding	1,75	gi 118474315	17	4,00	0,00002
Outros						
28	Hipotética	4,1	gi 118474618	44	7,20	0,001

1 – Spots referentes ao gel da figura 7 2 – Fator de aumento de expressão da proteína na amostra P3 em relação à amostra NCTC 10354^T. 3 – Número de acesso da proteína no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). 4 – Peso molecular em kDa. 5 – Ponto isoelétrico. 6 – Valor do P do teste de t Student.

Tabela 2 - Proteínas identificadas por MALDI – TOF significativamente diminuídas na amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 em relação à amostra parental *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T.

Spot ¹	Proteína	Varição ²	Nº GenBank ³	MM ⁴	pI ⁵	p ⁶
Metabolismo						
2	Biotin carboxilase	1,54	gi 118474608	29	8,14	0,00003
7	Molebdenum cofactor 3-deoxy mano	2,07	gi 118475331	34	9,31	0,0002 0,0004
12	octulosanate	2,36	gi 118474289 gi 153951787 + gi 86153230			0,00001
19	Mix 1 (oK atp+g) Glutamyl T RNA	3,42	gi 153951207	60	4,78	0,000001
20	reductase Phosphogluosaminase	3,31	gi 121613327	34	9,51	0,0001
24	mutase	1,37				
Regulação						
8	Transcriptional regulator	1,62		39	9,42	0,00045
Ligação e transporte						
16	Phosphate ABC transporter	2,41	gi 118474415	45	9,18	0,01
Fator de crescimento						
9	Lipoprotein NLPA	2,2	gi 118474186	28	6,72	0,0002
Outros						
6	Hipotética	1,90	gi 118475142	24	5,03	0,02
21	Hipotética GAT/Yqey family	1,55	gi 86150013	30	6,03	0,0003 0,0001
23	protein	2,67	gi 118474770	29	6,2	

1 – Spots referentes ao gel da figura 7 2 – Fator de diminuição de expressão da proteína na amostra P3 em relação à amostra NCTC 10354^T. 3 – Número de acesso da proteína no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). 4 – Peso molecular em kDa. 5 – Ponto isoelétrico. 6 – Valor do P do teste de t Student.

TABELA 3 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI – TOF QUE NÃO TIVERAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA EXPRESSÃO DA AMOSTRA *C. FETUS* SUBSP. *VENEREALIS* P3 EM RELAÇÃO À AMOSTRA PARENTAL *C. FETUS* SUBSP. *VENEREALIS* NCTC 10354^T.

Spot ¹	Proteína	Varição ²	NºGenBank ³	M M ⁴	pI ⁵	p ⁶
Metabolismo						
15	Cytochrome c551 peroxidase	1,04	gi 118475373	41	5,95	0,238
3	Chaperona Groel	0,73	gi 118474493	61	4,36	0,052
Adaptação						
4	Starvation inducible DNA binding	1,08	gi 118475381	12	5,50	0,358
Outros						
22	MLOA	1,05	gi 19881262	28	6,47	0,075
14	Hipotética	0,85	gi 86150013	56	6,05	0,624
5	Hipotética	0,97	gi 86150655	24	5,57	0,167
25	Hipotética	1,01	gi 118475294	41	6,16	0,356

1 – Spots referentes ao gel. da figura 7 2 – Fator de aumento de expressão da proteína na amostra P3 em relação à amostra NCTC 10354^T. 3 – Número de acesso da proteína no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). 4 – Peso molecular em kDa. 5 – Ponto isoelétrico. 6 – Valor do P do teste de t Student.

5 - DISCUSSÃO

Este estudo foi iniciado com a análise dos ensaios de aderência e acúmulo de RNAm para IL-8 em células HeLa infectadas, que demonstraram haver diferenças entre a amostra parental *C. fetus* subsp. *veneralis* NCTC 10354 e as amostras derivadas isoladas após infecção experimental de novilhas, P2 e P3. Esses resultados, associados à indicação de haver diferença de expressão protéica, estudado por eletroforese unidirecional, entre a amostra *C. fetus* subsp. *veneralis* NCTC 10354^T e a amostra *C. fetus* subsp. *veneralis* P1, isolada após a inoculação da amostra de referência na vagina de novilhas virgens

(Cottorello, 2006), indicou uma análise mais abrangente do perfil de proteínas das amostras de *C. fetus* subsp. *veneralis* após passagem em bovinos.

Desta forma foram utilizadas ferramentas de análise proteômica: eletroforese de proteínas em gel bidimensional e espectrofotometria de massa, para a identificação precisa e reprodutível de proteínas com perfil de expressão alterado em amostras de *C. fetus* subsp. *veneralis* passadas na espécie alvo.

Cottorello (2006) também comparou a aderência e o acúmulo de IL-8 RNAm em células HeLa de amostras de *C. fetus* subsp. *veneralis* de referência (NCTC

10354) e após recuperação dessa de novilha virgem infectada (amostra P1). Esta autora verificou que apenas uma passagem da amostra de *C. fetus* subsp. *venerealis* NCTC 10354^T na espécie alvo já contribuiu significativamente para o aumento de virulência e o aparecimento de diferenças no perfil unidimensional de proteínas pelo SDS – PAGE. Entretanto, as proteínas diferencialmente expressas não foram identificadas.

No presente estudo, foi verificado que a inoculação seriada de uma amostra de referência de *C. fetus* subsp. *venerealis*, NCTC 10354^T, em novilhas virgens induz o aumento gradativo no índice de aderência e na transcrição de IL-8 em células HeLa pelas amostras isoladas após a segunda (P2) e a terceira (P3) passagens na espécie alvo. Isto demonstra adaptação gradual da amostra repicada por anos *in vitro* ao ambiente do trato genital, o que resultou na expressão diferenciada de proteínas entre a amostra de referência utilizada em laboratório e a amostra isolada após a segunda passagem em novilhas virgens (Fig. 6 e 7, Tab. 1 e 2).

Um achado importante na análise proteômica das amostras de *C. fetus* subsp. *venerealis* foi o aumento na expressão de proteínas *Purine Binding Chemotaxis* (CheW) (*spot* 10, Fig. 6), *Flagellar Hook associated* (*spot* 13, Fig. 6), *Possible Lipoprotein* (*spot* 17, Fig. 7) e *Methyl*

accepting chemotaxis (*spot* 26, Fig. 7), relacionadas à adesão e motilidade (Tab. 1), o que corrobora os achados dos experimentos de adesão com as amostras estudadas (Fig. 4).

A proteína com maior aumento de expressão na amostra P3 (5,76 vezes) foi uma lipoproteína identificada como Possível Lipoproteína, descrita no genoma de *Campylobacter jejuni* (Poly et al, 2007).

Em um estudo realizado por Jin et al, 2001 com amostras de *Campylobacter jejuni*, é descrita uma lipoproteína, denominada JlpA (Jejuni Lipoprotein A) com massa molecular de 42,3 Kd, localizada na superfície bacteriana de amostras de *Campylobacter jejuni*, que facilita a ligação da bactéria com as células do hospedeiro.

Jin et al., (2003) demonstraram que interação de uma lipoproteína com a proteína Hsp 90kDa, sinalizam para ativação de NF- κ B e p38 MAP kinase (dois importantes fatores de transcrição de IL-8) em células epiteliais. Portanto, ao analisarmos os resultados de aderência e produção de IL-8 na amostra P3 (Fig 4 e 5), em associação ao aumento da proteína Hsp 90 kDA, (*spot* 18, Fig.6) podemos sugerir que a lipoproteína encontrada está participando destes processos, aumentando a aderência e a produção de IL-8. Mas, a identificação precisa da proteína não foi possível, pois o genoma do *C.fetus* subsp

venereallis não foi completamente seqüenciado, sendo assim muito escassa a quantidade de informações depositadas nos bancos de dados.

Outras três proteínas ligadas à adesão e motilidade que tiveram um aumento significativo na expressão na amostra *C. fetus* subsp. *venerealis* P3 *Purine Binding Chemotaxis* (*cheW*) (*spot* 10, Fig 7), *Methyl accepting chemotaxis* (*spot* 26, Fig 6), e *Flagelar hook asociated* (*spot* 13, Fig 6) participam do processo de motilidade da bactéria guiado por quimiotaxia, que é importante para a sobrevivência bacteriana em um ambiente desfavorável para o seu crescimento como, por exemplo, o ambiente vaginal ou uterino (Terry et al, 2005).

A quimiotaxia é um comportamento inato no qual bactérias direcionam seus movimentos de acordo com certas substâncias químicas no seu ambiente. Os componentes químicos são percebidos por múltiplos receptores transmembrânicos, denominados *methyl accepting proteins* (MCPs), os quais se transformam em moléculas capazes de detectar esses componentes. Estes receptores podem se ligar a atratores ou repelentes direta ou indiretamente através da interação com proteínas do espaço periplasmático. Os sinais para estes receptores são transmitidos pela membrana plasmática, onde proteínas CHE são ativadas (Lux e Shi, 2004).

MCPs são proteínas muito sensíveis, capazes de perceber ligantes específicos em baixas concentrações (Lin et al, 1994). Os sinais percebidos no ambiente pelos quimiorreceptores (MCPs) são repassados ao flagelo motor, via CheW, CheA, CheR e CheY e permitem ao microrganismo realizar deslocamentos correspondentes ao tipo de estímulo percebido (Lux e Shi, 2004).

Em *C. fetus* subsp. *venerealis* os flagelos estão localizados nas extremidades, podendo existir um ou dois flagelos polares (Dekeyser, 1984). Estruturalmente, o flagelo pode ser subdividido em três regiões: filamento, corpo basal e gancho, sendo estas duas últimas importantes para a inserção e movimento do filamento. O filamento dos flagelos apresenta estrutura helicoidal, com comprimento de onda constante para cada espécie. Este corresponde a um cilindro longo e oco, composto por unidades repetitivas de uma proteína denominada genericamente de flagelina, que pode variar de 30 a 60 kDa, dependendo do microrganismo. Sua extremidade distal é revestida por uma proteína seladora. O gancho apresenta maior espessura que o filamento, sendo composto por diferentes subunidades protéicas, entre elas a proteína encontrada no nosso estudo, flagelar hook associated (*spot* 13, Fig 6) (Macnab, 1996, 1999; Kallir et al.,2001)

Em bactérias patogênicas como *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni*, a importância da quimiotaxia e motilidade está bem estabelecida (Takata et al, 1992; Yao et al, 1997; Foyne et al, 2000, Terry et al., 2005).

Amostras bacterianas mutantes de *Helicobacter pylori*, que não produzem proteínas responsáveis pela quimiotaxia, *cheW*, *cheA* e *cheY*, falharam na colonização da mucosa gástrica e mucosa intestinal, provavelmente pela dificuldade em se locomover e penetrar na mucosa (Terry et al., 2005).

H.pylori e *C.jejuni* são conhecidos por realizarem quimiotaxia na direção de componentes presentes no muco, os quais, desempenham papel importante na identificação de sítios adequados de colonização (Nakazawa, 2002).

Outras infecções associadas à muco-quimiotaxia como por *Vibrio cholerae* e *Brachyspira hyodysenteriae* têm sido relatadas (Kennedy and Yancey, 1996). *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria flagelada que exibe motilidade dependente de pilus tipo IV. A colonização da superfície mucosa requer quimiotaxia em direção à mucina (Nelson et al., 1990) e foi demonstrada estar envolvida nos estágios iniciais da infecção (Feldman et al., 1998). A motilidade e quimiotaxia têm um papel importante no estabelecimento da infecção

por *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*, pois permite a bactéria identificar condições ideais de crescimento no muco vaginal e no útero, encontrando sítios adequados de colonização da mucosa.

Alkyl hidroperoxidase reductase e *Thiol peroxidase* são duas proteínas já descritas em *Campylobacter jejuni* e com a importância reconhecida. O estresse oxidativo é um grande problema para qualquer organismo (Storz et al., 1999). A habilidade do microrganismo em eliminar compostos oxidativos é a chave da sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Imlay, 2003). As bactérias têm uma grande variedade de mecanismos para combater estes compostos oxidativos. As *alkyl hidroperoxidase reductase* (AhpC) pertencem a família de enzimas conhecidas como peroxiredoxinas, que estão presentes em células eucariotas e procariontes (Wood et al., 2003; Poole, 2005). Em bactérias, AhpC confere resistência a uma ampla variedade de agentes de estresse oxidativo incluindo peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peróxidos lipídicos (Ellis, et al., 1997; Hillas et al., 2000; Seaver et al., 2001; Wang et al., 2004). Em 1999, Baillon et al. caracterizaram a regulação e demonstraram o envolvimento da proteína AhpC de *Campylobacter jejuni*, na aerotolerância e defesa contra o estresse oxidativo e sua importância em patógenos microaerófilos. A AhpC desempenha um papel importante na proteção de *C. jejuni*

durante sua transmissão de hospedeiro para hospedeiro, em ambientes onde há limitação de ferro por exemplo, que é um elemento essencial como cofatores para enzimas, o aumento da expressão de AhpC nessas condições contribui significativamente para a sobrevivência do microrganismo no meio ambiente durante a transmissão (Baillon et al., 1999).

Outra enzima da família das peroxiredoxinas conhecida, a *Thiol peroxidase* (Tpx), desempenha um importante papel na defesa contra estresse por superóxido e hiperóxido, bem como em altas concentrações de oxigênio, segundo um estudo realizado com amostras de *H.pylori* (Olezak et al., 2003; Comtois et al., 2003). Em um estudo com amostras de *C. jejuni*, Atack et al. (2008) demonstraram a importância da *Thiol peroxidase* na defesa contra o estresse oxidativo, particularmente contra o oxigênio molecular durante a fase exponencial de crescimento, onde aparece como uma enzima específica de detoxificação de peróxido de hidrogênio.

Em nosso experimento temos um aumento significativo na expressão dessas duas proteínas, sugerindo que elas desempenham um papel importante na sobrevivência e multiplicação do *C. fetus* subps. *venerealis* no hospedeiro. Sabendo-se que o *C. fetus* subsp. *venerealis* é um microrganismo microaerófilo e necessita de baixas concentrações de oxigênio para

multiplicar e para encontrar esse microambiente no hospedeiro é necessário dispor de mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo. Para sobreviver no muco cérvico vaginal e alcançar o útero o *C. fetus* tem que lançar mão de mecanismo de defesa no meio em que está e uma dessas formas é pelo aumento das enzimas peroxiredoxinas, identificadas aqui como *Alkyl hidroperoxidase redutase* (spot 29, Fig 6) e *Thiol peroxidase*(spot 1, Fig 6).

Atualmente, os estudos de patogenia de *C. fetus* subsp. *venerealis* se concentram nas mutações gênicas dos genes *sap* que levam a variações antigênicas nas proteínas superficiais de membrana (SAP). Em nosso trabalho não identificamos nenhuma proteína SAP, provavelmente pelo método de extração de proteínas utilizando CHAPS como detergente, que auxiliam a solubilização de proteínas e previnem a agregação através de interações hidrofóbicas. O uso de reagentes capazes de aumentar a solubilização de proteínas de membranas, como detergentes zwitteriônicos (Chevallet et al, 1998), pode permitir que proteínas hidrofóbicas como as proteínas integrais de membrana sejam identificadas em géis bidimensionais (Chevallet et al.,1998; Molloy et al., 1999; Henningsen et al., 2002), nas condições experimentais deste trabalho não utilizamos estes detergentes. No entanto, a separação de proteínas hidrofóbicas, principalmente aquelas de alta massa molecular, que é o

caso das proteínas SAP (Boot e Pouwels, 1996) continua a ser um desafio nos géis de eletroforese bidimensionais (Haynes et al., 2000).

O presente trabalho é o ponto de partida para uma investigação direcionada ao estudo da relação parasita-hospedeiro na campilobacteriose genital bovina. Até o presente momento não há estudos avaliando os mecanismos de virulência como quimiotaxia, motilidade e aderência, utilizados pelo *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* durante o estabelecimento da infecção no hospedeiro. Sugerimos que os próximos estudos devem focar nas proteínas, CheW, Flagelar Hook, Possible Lipoprotein e Methil accepting chemotaxis.

6- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. A passagem seriada de *C. fetus* subsp. *venerealis* em novilhas levam ao aumento gradual de aderência bacteriana e a indução da transcrição de IL-8 em células HeLa
2. Neste estudo foi demonstrada a presença de proteínas diferencialmente expressas em amostras de *Campylobacter. fetus venerealis* cultivadas em laboratório e amostras repassadas em animal.
3. As proteínas que foram encontradas aumentadas na amostra de *Campylobacter. fetus venerealis*

repassada em novilhas e que mais sugerem interação com mecanismos de virulência da bactéria foram: *Purine Binding Chemotaxis (CheW)*, *Flagelar Hook associated*, *Possible Lipoprotein e Methil accepting chemotaxis*.

6 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AEBERSOLD, R., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v.422, p.198-207, 2003.

ALDRIDGE P, HUGHES KT. Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* v.5., p.160-165, 2002.

AL-SALLOOM, F.S.; MAHMEED, A.A.; ISMAEEL, A. BOTTA, G.A, BAKHIET, M. *Campylobacter* – stimulated INT 407 cells produce dissociated cytokine profiles. *Journal of Infection*, v. 47, p. 217-224, 2003.

AMERICAN Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines on Euthanasia: Formely report of the AVMA panel on Euthanasia. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2007. 36pp.

ATAK, J.M.;HARVEY, P.;JONES, M.A.;KELLY, D.J. The *Campylobacter* jejuni Thiol peroxidase Tpx and Bcp both contribute to aerotolerance and peroxide-mediated stress resistance but have distinct

substrate specificities. *J.Bacteriology*. v.190; p.5279-5290;2008.

BAILLON, M.-L. A., A. H. M. VAN VLIET, J. M. KETLEY, C. CONSTANTINIDOU, AND C. W. PENN. An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* V.181., p.4798–4804, 1999.

BARDY SL, NG SY, JARRELL KF. Prokaryotic motility structures. *Microbiology* v.149,;p.295-304,2003.

BIELANSKI, A, SAMPATH, M.I., GRAHAM, J.K. et al. In vitro fertilization of bovine ova in the presence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 29, p. 488 – 493, 1994.

BOOT, H.J., POUWELS, P,H. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Molecular Microbiology*, v. 21, p. 1117-1123, 1996.

CANDIANO, G.;BRUSHI, M.;MEUANTE, L.;SANTUCCI, L.;GHIGGERI,G.M.;CARNEMOLLA,B.;ORE CHIA,P.;ZARDI,L.;RIGHETTI,P.G.Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteoma analysis. *Electrophoresis*, v.25, p.1327-1333, 2004.

CHAMRAD, D.C.;KORTING, G.;STUHLER, K.;MEYER, H.E.;KLOSE,J.;BLUGGEL, M. Evaluation of algorithms for protein

identification from sequence databases using mass spectrometry mass data. *Proteomics*, v.4, p.619-628, 2004.

CHEVALLET, M.; SABTONI, V.; POINAS, A.;ROUQUIE, D.; FUCHS, A.; KIEFFER, S.; ROSSIGNOL, M.; LUNARDI, J.; GARIN, J.;RABILLOUD, T. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, v.19, p.1901-1909, 1998.

COMTOIS, S. L., M. D. GIDLEY, AND D. J. KELLY.Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* .,v.149 p.121–129., 2003.

CORBEIL L.B. Immunization and diagnosis in bovine reproductive tract infections. *Adv Vet Med*, v. 41, p. 217-239, 1999.

CORBEIL, L. B.; CORBEIL, R.R.; WINTER, A.J. Bovine venereal vibriosis: activity of inflammatory cells in protective immunity. *Am J. Vet. Res.*, v. 36, p. 403 – 408, 1975.

CORBEIL, L.B. et al. Vaccines against sexually transmitted diseases. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.1, n. 118, 2003.

CORBEIL, L.B., DUNCAN, J.R., SCHURING, G.G.D., et al. Bovine venereal

vibriosis: variations in immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. *Infect. Immun.*, v. 10, p. 1084 – 1090, 1974a.

COTTORELLO, A.C.P. *Relação parasita – hospedeiro na infecção de células epiteliais in vitro por Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2006. 76p. Tese (Doutorado em Ciência Animal).

DEKEYSER, J. Bovine Genital *Campylobacteriosis*. IN: BUTZLER, J-P. *Campylobacter infection in man and animals*. Boca Raton: CRC Press, 1984. p 181 – 191.

DOZSA, L.; OLSON, N.O., CAMPBELL, A. The uterine biopsy technique for following the histologic changes caused by *Vibrio fetus* in the uterine mucosa. *Am. J. Vet. Res.*, p. 878 – 883, 1960.

DUBREUIL, J.D., LOGAN, S.M., CUBBAGE, S., et al. Structural and biochemical analyses of a surface array protein of *Campylobacter fetus*. *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4165 – 4173, 1988

DWORKIN, J. et al. A lipopolysaccharide-binding domain of the *Campylobacter fetus* SLP protein resides within the conserved N terminus of a family of silent and divergent homologs. *Journal of Bacteriology*, v. 177, n. 7, p. 1734-1741, 1995a.

DWORKIN, J., BLASER, M.J. Molecular mechanisms of *Campylobacter fetus* surface layer protein expression. *Mol. Microbiol.* V. 26, p. 433 – 440, 1997.

EAGLESOME, M.D., GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I, *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Bull*, v. 62, p. 743 – 775, 1992.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F., FIERER, J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 4569-4574, 1993.

EISENBACH M. Bacterial chemotaxis. In: Nature encyclopedia of life sciences. London:Nature Publishing group,<http://www.els.net> [doi:10.1038/ngp.els.0001251]. 2000.

ELIAS, J.E.;HAAS, W.;FAHERTY, B.K.;GYGI, S.P. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nature Methods*, v.2, p.667-675, 2005.

ELLIS, H. R., AND L. B. POOLE. Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella*

typhimurium. *Biochemistry*. V.36, p.13349–13356., 1997.

ENG, J.K.; MCCORMACK, A.L.; YATES, J.R. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v.5, p.976-989, 1994.

FELDMAN M, BRYAN R, RAJAN S, SCHEFFLER L, BRUNNERT S, TANG H, *et al.*. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun*.v. 66, p.43-51.,1998.

FOYNES S, DORRELL N, WARD SJ, STABLER RA, MCCOLM AA, RYCROFT AN, *ET AL.* *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect Immun*. V. 68.;p.2016-2023.,2000.

FRANK, A.H., SHALKOP, W.T. BRYNER, J.H. Cellular changes in the endometrium of *Vibrio fetus* – infected and non - infected heifers. *Am. J. Vet. Res.*, v. 23, p. 1213 – 1216, 1962.

FUJIMOTO, S. *et al.* Correlation between molecular size of the surface array protein and morphology and antigenicity of the *Campylobacter fetus* S layer. *Infection and Immunity*, v. 59, p. 2017- 2022, 1991.

GARCIA, M.M., BROOKS, B.W. *Campylobacter*. In: PRESCOTT, J.F., ZUERMER, R.L., GYLES, C.L., THOEN C, C.D. (Ed.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2^a ed., Iowa States University Press, p. 262 – 272, 1993.

GARCIA, M.M., LUTZE-WALLACE, C.L., DENES, A.S., *et al.* Protein shifty and antigenic variation in the S layer of *C. fetus* subsp. *venerealis* during bovine infection accompanied by genomic rearrangement of sap A homologs. *J. Bacterol.*, v. 177, n. 8, p. 1976 – 1980, 1995.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. V.25.;p.386-401., 2001.

GORG, A.; BOGUTH, G.; OBERMAIER, C.; POSCH, A.; WEISS, W. 2-Dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (ipg-dalt) – the state-of-the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*, v.16, p.1079-1086, 1995.

GORG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with

immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v.21, p.1037-1053, 2000.

GRAHAM, L.L. *Campylobacter fetus* adheres to and enters INT 407 cells. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 995 – 1007, 2002.

GRAVES, P. R.; T. A. HAYSTEAD. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.*;v. 66; p.39-63; 2002.

GRISWOLD IJ, DAHLQUIST FW. The dynamic behavior of CheW from *hermotoga maritima* in solution, as determined by nuclear magnetic resonance: implications for potential protein-protein interaction sites. *Biophys Chem* v.101-102.;p.359-373.,2002.

HAMMES, B.D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. 3.ed. Oxford: oxford University Press, 2002.345p.

HAYNES, P.A.; YATES, J.R. Proteome profiling-pitfalls and progress. *Yeast*, v.17, p.81-87, 2000.

HENNINGSEN, R.; GALE, B.L.; STRAUB, K.M., DeNAGEL, D.C. Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for twodimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, v.2, p.1479-1488, 2002.

HICKEY, T.E.; BAQAR, L.; BOURGEOIS, D.P.; EWING, C., GUERRY, P. *Campylobacter jejuni*- stimulated secretion

of interleukin-8 by INT 407 cells. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 88-93, 1999.

HILLAS, P. J., F. S. DEL ALBA, J. OYARZABAL, A. WILKS, AND P. R. ORTIZ DE MONTELLANO. The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 275:18801–18809., 2000.

HU L., MCDANIEL J.P., KOPECKO D.J. Signal transduction events involved in human epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni* 81-176. *Microb Pathog.*, v.40, n.3, p.91-100, 2006.

HUM, S.;QUINN, K; BRUNNER, J. Evaluation of PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Australian Veterinary Journal*, v.75, n11, p827-831, 1997.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* v.57., p.395–418., 2003.

JIN, S.; JOE, A.; LYNETT, A.; HANI,E.K.; SHERMAN, P. ; CHAN, V.L. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Molecular Microbiology*, V. 39, p.1225-1236, 2001.

JIN, S.; SONG, Y.;EMILI, A.;SHERMAN, P.M.;CHAN, V.L.; JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface exposed heat

- shock protein 90 α and triggers signaling pathways leading to the activation of NF- κ B and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell. Microbiol.* V.5., p.165-174, 2003.
- JONES, M.A.; TOTEMEYER, S.; MASKELL, D.J. et al. Induction of proinflammatory responses in the human monocytic cell line THP-1 by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, v. 71, n. 5, p. 2626 – 2633, 2003.
- JONSSON, A. P. Mass spectrometry for protein and peptide characterization. *Cell Mol Life Sci* v.58.;p.868-84.;2001.
- KALIR S, MCCLURE J, PABBARAJU K, SOUTHWARD C, RONEN M, LEIBLER S, ET al.. Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* .;v.292.;p.2080-2083.,2001.
- KENNEDY MJ, YANCEY RJ JR. Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 49:21-30.,1996.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, 1975.
- KUNKEL, S.L., LUKACS, N.W.; CHENSUE, S.W. et al. Chemokines and the inflammatory response. In: REMICK, D. G., FRIEDLAND, J.S. (Ed). *Cytokines in health and disease*. New York : M. Dekker, 1997. 678p.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LAGE, A.P., LEITE, R.C. Campilobacteriose genital bovina (Vibriose). *Pecuária de Corte*, n. 10, p. 50 – 54, 2000
- LEFKOVITS, I. Functional and structural proteomics: a critical appraisal. *Journal of Chromatography B*, v.787, p.1-10, 2003.
- LEITE, R.C. *Avaliação de alguns métodos de diagnóstico e análise custo/benefício do controle da campilobacteriose bovina*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1977. 38p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- LEITE, R.C., REIS, R., RIVERA, F.E.B. Controle da vibriose bovina através da vacinação. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 32, p. 259 – 264, 1980.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v.25, p.402-408, 2001.

- LUX, R.;SHI, W. Chemotaxis-guided movements in bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*.v.15; p.207-220, 2004.
- MACNAB RM . Flagella and motility. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Vol.1. Neidhardt FC, Curtis RI, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, *et al.*, editors. Washington, DC: ASM Press, pp. 123-145., 1996.
- MACNAB RM. The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J Bacteriol* 181:7149-7153, 1999.
- MANN, M., R. C. HENDRICKSON, ET AL. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.*; v.70. p.437-73.;2001.
- MCBRIDE MJ. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* 55:49-75. 2001.
- MILES, A. A.; MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.* v. 38, p. 732-742, 1938.
- MIRANDA, K.L. Prevalência da infecção por *Campylobacter fetus* em bovinos de corte no Brasil – 2000. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- MOLLOY, M.P.; HEBERT, B.R.; WILLIAMS, K.L.; GOOLEY, A.A. Extraction of *Escherichia coli* proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, v.20, p.701-704, 1999.
- MONTEVILLE, M.R.; YOON, J.E., KONKEL, M.E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology*, v.149, p. 153-165, 2003.
- NAKAZAWA T. Growth cycle of *Helicobacter pylori* in gastric mucous layer. *Keio J Med.*, v.2., p.15-19.2002.
- NELSON JW, TREDGETT MW, SHEEHAN JK, THORNTON DJ, NOTMAN D, GOVAN JR. Mucinophilic and chemotactic properties of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary colonization in cystic fibrosis. *Infect Immun* v.58. p.1489-1495, 1990.
- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* . v.250.; p. 4007-21., 1975.
- OLCZAK, A. A., R. W. SEYLER, JR., J. W. OLSON, AND R. J. MAIER. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infect. Immun.* v.71, p.580–583, 2003.

- ONG, S.E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*, v.1.,p.252-262, 2005.
- PEI, Z., ELLISON, R.T., LEWIS, R.V. et al. Purification and characterization of a family of high molecular weight surface array proteins from *C. fetus*. *J. Biol. Chem.*, v.263, p. 6416 – 6420, 1988.
- PEI, Z.; BURUCOA, C.; GRIGNON, B. et al. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 938 – 943, 1998.
- PELLEGRIN, A. O., LAGE, A. P., SERENO, J. B., RAVAGLIA, E., COSTA, M., LEITE, R. C. . Bovine Genital Campylobacteriosis in Pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revue d Elevage Et de Medicine Veterinaire Des Pays Tropicaux*, v. 55, n. 3, 2002.
- PELLEGRIN, A.O. A campilobacteriose e tricomonose são doenças reemergentes? *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23, n. 4, p. 479 – 566, 1999.
- PELLEGRIN, A.O., SERENO, J.R.B., LEITE, R.C., COSTA, G.M., COSTA E SILVA, E. Campilobacteriose genital bovina em touros do mato grosso do sul. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 21, n.1, p. 43 – 46, 1998.
- PERKINS, D.N.,PAPPIN, D.J.; CREASY, D.M.;COTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence data base using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, v.20, p.3551-35567, 1999.
- POOLE, L. B. Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Arch. Biochem Biophys*.v.433, p.240–254., 2005.
- POOLY,F.,READ, T.,TRIBBLE, D.R.,BAQAR, S.,LORENZO, M.,GUERRY,P. Genome sequence of *Campylobacter jejuni* from Thailand. *Infec.Imm.* v.75, p.3425-3433, 2007.
- RAY, K.C. et al. *Campylobacter fetus* sap inversion occurs in the absence of RecA function. *Infection and Immunity*, v.68, p.5663-5667, 2000.
- RIGHETTI, P.G.; GIANAZZA, E.;GELFI, C.;CHIARI, M.;SINHA, P. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Analytical Chemistry*, v.61, p.1602-1612, 1989.
- RIOS, P.A.G.M. Aderência e invasibilidade em células HeLa de amostras de *Campylobacter* spp isoladas de animais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2005. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

- ROBERTS, J. S. *Veterinary obstetrics and genital disease*. 2^a Ed, Ithaca, New York, 1971.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 1^o Ed. Belo Horizonte: FEP – MVZ, 1998. 221p.
- SCIENTIFIC VETERINARY COMMITTEE, Animal Welfare Section. 1997. The welfare of intensively kept pigs. For the European Commission; Report nr Doc XXIV/B3/ScVC/0005/1997, p. 91.
- SEAVER, L. C., AND J. A. IMLAY. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* V.183., p.7173-7181.,2001.
- SIMON, J.; MCNUTT, H. Histopathological alterations of the bovine uterus. I Studies with *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.*, p. 53-66, 1976.
- SOTO, P., Di ROCO, M.J. *Campylobacteriosis bovina: Prevalência en diversas zonas de la Republica Argentina. Rev. Invest. Agropec.*, v. 19, p. 273-279, 1984.
- STEEN, H. AND M. MANN . The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* ;v.5.;p. 699-711.;2004.
- STOCK AM, ROBINSON VL, GOUDREAU P. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.*v.69.;p.183-215,2000.
- STORZ, G., AND J. A. IMLAY. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* v.2.,p.188–194, 1999.
- TAKATA T, FUJIMOTO S, AMAKO K. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infect Immun*, v.60, p.3596-3600, 1992.
- TAY H, PARSONS CL, STEINPC. Electrophysiologic monitoring of the effects of soluble virulence factors produced by *Escherichia coli* infection in urine. *Urology*. 48(3):389-92. 1996
- TENOVER, F.C.; DNA probes for antimicrobial susceptibility testing. *Clin.Lab.Med.*; v.9.;p.341-347.; 1989.
- TERRY,K.; WILLIAMS, S.M.;CONNOLY,L.;OTTEMANN,K.M. Chemotaxis paly's multiple roles during *Helicobacter pylori* animal infection. *Infec.Imm.* v.73.;p.803-811.;2005.
- THOMPSON, S.A. *Campylobacter* surface-layers (S-layers) and immune evasion. *Ann Periodontol*, v.7, n.1, p.43-53, 2002.
- THOMPSON, S.A; BLASER, M.J, Pathogenesis of *Campylobacter fetus*

- infections. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. *Campylobacter*. 2. ed. Washington: ASM, 2000.p. 321-347.2000.
- TU, Z. et al. Mechanisms Underlying *Campylobacter fetus* Pathogenesis in Humans: Surface-Layers Protein Variation in Relapsing Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, v.191, p.2082-2089, 2005.
- TYERS, M. AND M. MANN .From genomics to proteomics. *Nature* v.422.;p. 193-197.;2003.
- VANDAMME P. Taxonomy of the family *campylobacteraceae*. In: NACHAMKIN, I., BLASER, M.J. *Campylobacter*. 2ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C, p. 3 – 25, 2000.
- VILLAR, J. A., SPINA, E. M. *Campylobacteriosis* (Vibriosis) Bovina. Una recopilación de datos sobre su incidencia en el período 1966-1981. *Gac. Vet. B. Aires*, v. 44, p. 659 – 657, 1982.
- WANG, E. et al. Shift in S Layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 16, p. 4979-4984, 1993.
- WANG, G., A. A. OLCZAK, J. P. WALTON, AND R. J. MAIER. Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infect. Immun.* V.73, p.378–384, 2005.
- WASSENAAR T.M.; BLEUMINK-PLUYM, N. M.; VAN DER ZEIJST, B.A.M. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that flaA but not flaB is required for invasion. *Embo Journal*, v. 10, n. 8, p. 2055-2061, 1991.
- WOOD, Z. A., E. SCHRODER, J. R. HARRIS, AND L. B. POOLE. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* v.28. p.32-40.,2003.
- WOOLDRIGE, K.G.; KETLEY, J.M. *Campylobacter*- host cell interactions. *Trends in Microbiology*, v. 5, n. 3, p. 96 – 102, 1997.
- YAO R, BURR DH, GUERRY P. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. *Mol Microbiol* 23:1021-1031.,1997.

i