



**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Rede Nordeste de Biotecnologia
Universidade Federal da Bahia
- Ponto Focal -**

MARIA DA CONCEIÇÃO AQUINO DE SÁ

***Corynebacterium pseudotuberculosis*: ASPECTOS
MOLECULARES DE CEPAS PRODUTORAS E NÃO PRODUTORAS
DE BIOFILME E DA RESPOSTA IMUNE POR ELAS INDUZIDA NUMA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAPRINOS**

Salvador - BA

Fevereiro/2018

MARIA DA CONCEIÇÃO AQUINO DE SÁ

***Corynebacterium pseudotuberculosis*: ASPECTOS
MOLECULARES DE CEPAS PRODUTORAS E NÃO PRODUTORAS
DE BIOFILME E DA RESPOSTA IMUNE POR ELAS INDUZIDA NUMA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Roberto Meyer

Coorientador: Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Salvador - BA

Fevereiro/2018

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Conceição Aquino de Sá, Maria
Corynebacterium pseudotuberculosis: ASPECTOS MOLECULARES DE
CEPAS PRODUTORAS E NÃO PRODUTORAS DE BIOFILME E DA RESPOSTA
IMUNE POR ELAS INDUZIDA NUMA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAPRINOS
/ Maria Conceição Aquino de Sá. -- SALVADOR, 2018.
153 f. : il

Orientador: ROBERTO JOSÉ MEYER NASCIMENTO.
Coorientador: MATEUS MATIUZZI DA COSTA.
Tese (Doutorado - RENORBIO/UFBA) -- Universidade Federal da
Bahia, INSTITUTO DE CIÊNCIA DA SAÚDE, 2018.

1. Linfadenite Caseosa. 2. genoma. 3. Corynebacterium
pseudotuberculosis. 4. antigenicidade. 5. testes diagnósticos.
I. JOSÉ MEYER NASCIMENTO, ROBERTO. II. MATIUZZI DA COSTA,
MATEUS. III. Título.



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Reitor Miguel Calmon s/n – Vale do Canela
40100-000, Salvador-BA



Telefone: (71) 3283-8826 - E-mail: renorbioba@ufba.br

TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

“Corynebacterium pseudotuberculosis: aspectos moleculares de cepas produtoras e não produtoras de biofilme e da resposta imune por elas induzida numa infecção experimental em caprinos”

Elaborada por:

MARIA DA CONCEIÇÃO AQUINO DE SÁ

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de **DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador, Bahia, 27 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Roberto José Meyer Nascimento
(Orientador)

Universidade Federal da Bahia

Dr. José Ferreira Nunes
Universidade Estadual do Ceará

Dr. Rodolfo de Moraes Peixoto

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano

Dr.ª Nubia Seyffert

Universidade Federal da Bahia

Dr. Paulo Cirino de Carvalho Filho
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Dr. Vasco Ariston Azevedo
Universidade Federal de Minas Gerais

“Não espere viver sem problemas, de vez que problemas são ingredientes de evolução, necessários ao caminho de todos.”

André Luiz

Dedicado a minha colega-irmã, Mariana Assis, esse Doutorado é nosso.

(in Memoriam)

AGRADECIMENTOS

Ao criador do universo, pela dádiva da vida.

A FAPESB, pela bolsa concedida e a FAPEX, pelo financiamento do Projeto.

Às filhas, Samilly por ser uma filha muito amável e exemplar e me ajudar nas discussões científicas e Emilly pelo apoio e carinho que sempre me dá.

Ao Professor Roberto Meyer, que aceitou uma desconhecida para orientar sem nenhuma dificuldade e foi meu grande apoio, serei sempre agradecida.

Ao Professor Mateus Matiuzzi, que mesmo longe sempre me aconselhou, obrigada.

A Tadeu Raynal, meu parceiro, amigo incondicional, minha eterna gratidão.

À Maria Alcantara, meu anjo, obrigada por sua disponibilidade e sua amizade.

A Ramon, uma grande parceria no *Blotting* e na vida.

A Gilvan, Isabela, Sr. Ari, Badu, Sr. Mário, Amália, Geraldo, Alan, Mariane, Marquinhos, Marcão, Marcos Ribeiro, Bruno Bastos, Thiago Souza, Barral, Fúlvia, Rejane, Igor, Victória e a todos que me ajudaram no experimento, meus agradecimentos.

A todos os amigos do LABIMUNO, em especial à D. Zilda, Rafaela, D. Chica, Sr. Zé, Sr. Manoel e ao Sr. Mário, nunca esquecerei os nossos cafés, todos estão no meu coração, ganhei uma nova família.

Ao Professor Ricardo Portela, por todos os ensinamentos, minha enorme gratidão.

À Professora Lilia Moura-Costa, por ceder às instalações do L. de Microbiologia.

Ao Professor Vasco Azevedo por ceder às instalações do LGCM – UFMG.

Ao Prof. Henrique Figueiredo pelas análises da proteômica no L. Aquacen – UFMG.

Ao Professor Eudes e ao Doutorando Rafael do LAPEMM, pelo uso das instalações.

Às professoras Soraya Trindade, Vera Vale, Songeli Freire, pelo carinho.

Ao Professor Rodolfo Peixoto, suas sugestões sempre me ajudaram.

Ao Dr. Paulo Cirino e ao Dr. José Nunes por aceitar fazer parte da minha Banca.

À Dra. Silvana Marchioro, à Dra. Núbia Seyffert e ao Prof. Thiago Luiz, suas contribuições foram essenciais para o término desse trabalho.

A minhas amigas Nykita e Dalinne, os meus dias em Salvador foram menos solitários e aos companheiros do Ap foram tantos durante esses quatro anos, mas sentirei falta de cada um, em especial a minha irmã-amiga Renilde e aos últimos navegantes, Thomaz, Jocasta e Willian.

RESUMO

A procura por produtos da caprino-ovinocultura é frequente e contribui para aumentar a economia mundial, por isso é necessário produzir em larga escala e com qualidade para atender à demanda da população. Entretanto, diversos fatores na criação desses animais ainda necessitam melhorar, principalmente na área sanitária, na qual muitas doenças acometem o rebanho, dentre elas, a Linfadenite Caseosa, doença causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria que apresenta sua toxicidade através de genes de virulência, assim como pela produção de biofilme, que protege a bactéria de ambientes hostis. Dessa forma, estudos sobre esse patógeno são necessários, a exemplo do sequenciamento genômico, na busca de conhecer genes para análises de biomoléculas e com isso compreender melhor a sua antigenicidade e imunogenicidade com o objetivo de melhorar a especificidade e sensibilidade de testes sorológicos, utilizados como prevenção da doença no rebanho. Além disso, é essencial entender o mecanismo de patogenicidade desta bactéria no hospedeiro e suas formas de defesa no sistema imunológico do animal. Assim, no presente estudo, foram caracterizados os genomas de quatro cepas de *C. pseudotuberculosis*, comparando as cepas produtoras (OVI2C, CAPJ4) e não produtoras (OVI03, CAP3W) de biofilme. As cepas foram extraídas para produção de antígenos somáticos e de superfícies. A partir de estudos prévios com *immunoblotting*, foram escolhidas as cepas de origem caprina (CAPJ4 e CAP3W) para o estudo *in vivo* com dezoito caprinos da raça Canindé, divididos em três grupos experimentais, um grupo controle e dois grupos infectados com cepas de *C. pseudotuberculosis*, para avaliar a patogenia clinicamente, realizando hemograma, além de outras análises sorológicas através do ensaio de ELISA e *Western Blotting*. Também foi realizada a cultura de células sanguíneas para o estudo da imunidade celular com IFN- γ e cultivo de células mononucleares do sangue periférico para observar a modulação da expressão de proteínas do sistema GTPases, Rab 5 e Rab 7. Após esses estudos, observou-se que os genes contidos no genoma das cepas de *C. pseudotuberculosis* possuem similaridade, mostrando que eles são altamente conservados. A extração das bactérias resultou em antígenos de superfície F3, que apresentaram reatividade no *immunoblotting* frente aos soros de ovinos experimentalmente infectados. De todos os antígenos, os de origem caprina, apresentaram melhor antigenicidade. No experimento *in vivo*, após a infecção dos animais, foram realizadas outras colheitas de sangue e foi possível observar que a cepa produtora de biofilme é mais resistente, causando danos maiores aos animais. Para as condições de infecção experimental, os valores do hemograma estão dentro dos parâmetros. Na análise sorológica os caprinos infectados experimentalmente responderam à exposição primária, o que contribui para o aumento da imunoglobulina IgG. A produção de IFN- γ também foi observada. Foi verificado que as cepas de *C. pseudotuberculosis* produtora e não produtora de biofilme podem alterar a expressão de proteínas Rab 5 e Rab 7 em macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico cultivados *in vitro*. Esses resultados forneceram informações importantes para a produção de testes diagnósticos, com maior acurácia.

Palavras-chave: Linfadenite Caseosa, genoma, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, antigenicidade, testes diagnósticos.

ABSTRACT

The consumption of sheep and goat products is frequent and increases the values of world economy, so it is necessary to produce large scale and quality to meet the demand of population. However, several factors in the breeding of these animals still have to improve, especially in sanitary area, where many diseases affect the cattle, among them, Caseous Lymphadenitis, caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a bacterium that presents its toxicity through virulence genes, also by production of biofilm that protects the bacteria from hostile environments. Thus, studies of this pathogen are necessary, such as genomic sequencing, in search to know antigenic genes for biomolecule analysis and with this to understand better its antigenicity and immunogenicity, to be possible improve the specificity and sensitivity of serological tests, that are used as prevention of disease in the herd. Besides, it is essential to understand the mechanism of pathogenicity of this bacterium in host and its forms of defense against the animals immune system. At the present study, the genomes of four strains of *C. pseudotuberculosis* were characterized, comparing the biofilm producing (OVI2C, CAPJ4) and non-producing (OVI03, CAP3W) strains. These strains were extracted for production of somatic and surfaces antigens. From previous studies with immunoblotting, strains of goat origin (CAPJ4 and CAP3W) were chosen for *in vivo* study with 18 Canindé goats, divided into three experimental groups, one control group and two groups infected with strains of *C. pseudotuberculosis*, to evaluate clinically the pathogenesis and through hemogram, in addition to other serological tests as ELISA assay and *Western Blotting*. Also was performed blood cell culture for the study of cellular immunity with IFN- γ , as culture of peripheral blood mononuclear cells to observe the modulation of expression of GTPases, Rab 5 and Rab 7 system proteins. After these studies, it was observed that the genes contained in the genome of the strains of *C. pseudotuberculosis* are genetically homogeneous, showing that they are highly conserved. The extraction of bacteria resulted in F3 surface antigens, that showed reactivity in immunoblotting against sera from experimentally infected sheep. Of all antigens, those of goat origin had better antigenicity. At the *in vivo* experiment, after the infection of animals, other blood samples were collected and it was possible to observe that the biofilm producing strain is more resistant, causing greater damages to animals. For the conditions of experimental infection, blood count values are between normal limits. In the serological analysis, the experimentally infected goats responded to primary exposure, which contributes to increase of immunoglobulin IgG. The production of IFN- γ was also observed. In conclusion, it was observed that strains of *C. pseudotuberculosis* producing and not producing biofilm can modify the expression of Rab proteins in macrophages derived from mononuclear cells of peripheral blood cultivated *in vitro*. These results provided important information for production of diagnostic tests, with greater accuracy.

Key words: Caseous Lymphadenitis, genome, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, antigenicity, diagnostic tests.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Genes presentes no genoma das cepas de *C. pseudotuberculosis* OVI2C, OVI03, CAPJ4, CAP3W. Os reguladores DtxR e RipA que controlam a homeostase do ferro e as interações reguladores de gene envolvido na absorção de ferro.....49

CAPÍTULO II

Figura 1. Medida da densidade óptica (média) no ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) com fração dos antígenos de superfície (F3) de cepas produtoras e não produtoras de biofilme.....63

Figura 2. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata dos antígenos de superfície (F3) das cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme (T, cultivo com tween 80 no meio).....65

Figura 3. *Western Blotting* com perfil de reatividade para antígeno de superfície, para as amostras 16, 21, 60 e 76 cultivadas com BHI e BHI Tween-80 (T) frente a um *pool* de soro de ovinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*.....66

CAPÍTULO III

Figura 1. Perfil do hematócrito observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) – infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.....79

Figura 2. Perfil de leucócitos totais observados ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) - infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle80

Figura 3. Perfil de neutrófilos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) – infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatística significativa, segundo o teste de ANOVA. Entre “b” e “c” - $p < 0,05$81

Figura 4. Perfil de linfócitos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) – infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.....81

Figura 5. Perfil de monócitos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) - infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.....82

Figura 6. Perfil de eosinófilos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) – infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatística significativa, segundo o teste de ANOVA. Entre “a” e “b” - $p < 0,05$83

Figura 7. Perfil de basófilos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) - infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.....84

CAPÍTULO IV

Figura 1. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue das proteínas recombinantes nanH, sodC, pknG e spaC.....100

Figura 2. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) - infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade óptica (DO) 0,230. Placas de poliestireno de 96 cavidades sensibilizado com o antígeno BHI.....103

Figura 3. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade óptica (DO) 0,162. ELISA sensibilizado com o antígeno F3 21.....104

Figura 4. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade ótica (DO) 0,145. ELISA sensibilizado com o antígeno MQD 21..... 104

Figura 5. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade ótica (DO) 0,287. ELISA sensibilizado com o antígeno F3 76..... 105

Figura 6. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade ótica (DO) 0,111. ELISA sensibilizado com o antígeno MQD 76..... 105

Figura 7. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A letra A representa a proteína NanH, a letra B, a proteína SodC, a letra C a proteína PknG e a letra D a proteína SpaC..... 107

Figura 8. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental, mostrando a resposta a sensibilização de todos os antígenos (BHI, F3 21, MQD 21, F3 76 e MQD 76)..... 107

Figura 9. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo 21 (n=6), animais infectados com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme mostrando a resposta a todos os antígenos (BHI, F3 21, MQD 21, F3 76 e MQD 76)..... 108

Figura 10. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo 76 (n=4), animais infectados com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme mostrando a resposta a todos os antígenos (BHI, F3 21, MQD 21, F3 76 e MQD 21)..... 108

Figura 11. Membrana do *western blotting* com perfil de reatividade para antígeno de superfície F3 21 frente ao *pool* de soros caprinos do Grupo controle (P1); Grupo 21 (P2), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme;

Grupo 76 (P3), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme.....110

Figura 12. *Western blotting* com perfil de reatividade para o antígeno de superfície F3 76 frente ao pool de soros caprinos do Grupo controle (P1); Grupo 21 (P2), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; Grupo 76 (P3), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme.....110

Figura 13. Produção *in vitro* de IFN- γ em cultura de sangue total de caprino do grupo Controle (n=6) (A); grupo 21 (n=6) (B); grupo 76 (n=4), sob estímulo de antígenos TPP 21- *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e TPP 76 - *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme.....113

CAPITULO V

Figura 1. Imagem em microscópio invertido e de fluorescência (Nikon Eclipse), onde na figura 1A mostra o cultivo de PBMC no período de 14 horas e na figura 1B, o cultivo estabelecido em 5 dias.....127

Figura 2. Imagem em microscópio invertido e de fluorescência (Nikon Eclipse), onde mostra macrófagos diferenciados.....128

Figura 3. Imagem em microscópio invertido e de fluorescência (Nikon Eclipse), mostrando cultivo de macrófagos com 15 dias de cultivo.....129

Figura 4. Intensidade de Fluorescência de Rab 5 e Rab 7 em macrófagos não infectados e após 3 horas de infecção com a linhagem 21 e a linhagem 76 de *C. pseudotuberculosis* quantificada por citometria de fluxo (1 caprino).....130

Figura 5. Gráfico com intensidade de fluorescência de Rab5 em macrófagos não infectados e após 3 horas de infecção com a linhagem 21 e a linhagem 76 de *C. pseudotuberculosis* quantificada por citometria de fluxo nos tempos zero e com 180 dias de infecção com essas mesmas linhagens.....131

Figura 6. Gráfico com intensidade de fluorescência de Rab 7 em macrófagos não infectados e após 3 horas de infecção com a linhagem 21 e a linhagem 76 de *C. pseudotuberculosis* quantificada por citometria de fluxo nos tempos zero e com 180 dias de infecção com essas mesmas linhagens.....132

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1. Montagem das Linhagens de *C. pseudotuberculosis* para sequenciamento no programa SPAdes versão 3.6.....46

CAPITULO II

Tabela 1. Quantificação proteica da fração do antígeno de superfície (F3) extraída com butanol a 9%.....62

CAPITULO III

Tabela 1. Distribuição de animais nos três grupos experimentais: Grupo 1 - Controle; Grupo 2 - Infectado experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme (21) e Grupo 3 - Infectado experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme (76).....76

Tabela 2. Registros de ocorrências relevantes durante o experimento em caprinos infectados e não infectados com *C. pseudotuberculosis* produtor e não produtor de biofilme.....78

Tabela 3. Registros de ocorrências relevantes durante o *post mortem* em caprinos infectados e não infectados com *C. pseudotuberculosis* produtor e não produtor de biofilme.....79

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Distribuição de animais nos três grupos experimentais: Grupo 1 - Controle; Grupo 2 - Infectado experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme (21) e Grupo 3 - Infectado experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme (76).....95

Tabela 2. Quantificação proteica da fração do antígeno de superfície (F3) extraída com butanol a 9%, meio sintético quimicamente definido (MQD) e partição de três fases (TPP), concentração mensurada em mg/mL.99

Tabela 3. Valores obtidos através da curva ROC para os testes ELISA, com os diferentes antígenos utilizados (BHI, F3 21, MQD 21, F3 76 e MQD 76).....101

Tabela 4. Reconhecimento antigênico para a Fração F3 21, ao longo de 180 dias após inoculação nos grupos 21 e 76: Grupo 21 = (X) e Grupo 76 = (Y).....111

Tabela 5. Reconhecimento antigênico para a Fração F3 76, ao longo de 180 dias após inoculação nos grupos 21 e 76: Grupo 21 = (X) e Grupo 76 = (Y).....111

Tabela 6. Interpretação do Teste Cervical Comparativo (TCC), segundo o PNCEBT (MAPA, 2006).....114

Tabela 7. Resultado do Teste Cervical Comparativo (TCC) em caprinos do Grupo controle; Grupo 21, infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; Grupo 76, infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme.....114

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%- Percentual

°C – Graus Celsius

µG - Micrograma

µL – Microlitro

ANOVA - Análise de variância

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina Trisfosfato

B- Branco

BHI – Infusão de Cérebro - Coração

BSA- Albumina Sérica Bovina

C- Caprino

C. pseudotuberculosis – *Corynebacterium pseudotuberculosis*

C22 – Carbono 22

C36 – Carbono 36

CAMP - Christie, Atkins e Munch-Petersen

CD4 – Conglomerado de Diferenciação (*Cluster of differentiation*) 4

CD8- Conglomerado de Diferenciação (*Cluster of differentiation*) 8

CDS – *Coding DNA Sequence*

CEUA – Comissão de [Ética no Uso de Animais

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média

Ciu – Transportadores de efluxo

CMN – Células Mononucleares

CMNR- *Corinebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus*

CN – Controle Negativo

CO²- Gás Carbônico

CP- Controle Positivo

Cp40 – Serina Protease Corinebacteriana 40

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNAa (*Chromosomal replication inicator protein dnaA*)

DO- Densidade Ótica

DOA – Densidade ótica da Amostra

DOCN – Densidade Ótica do Controle Negativo
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
EPS- Substâncias Poliméricas Extracelulares
F1 – Fração de Superfície 1
F2 – Fração de Superfície 2
F3 – Fração de Superfície 3
FA - Fosfatase Alcalina
Fag A – Proteína integral de membrana
Fag B - Transportador de enterobactina de ferro
Fag C – ATP-proteína de ligação da membrana citoplasmática
Fag D – Sideóforos-proteína de ligação de ferro
FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FC - Fragmento Cristalizável
g – Grama
GenBank – *Genetic sequence database*
GTP – Trisfosfato de Guanosina
GTPase – Enzima Hidrolase que ligam-se e hidroliza GTP
h- Hora
H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico
HGM – Hemoglobina Globular Média
HZ - Hertz
ICS- Instituto de Ciências da Saúde
IFN- γ – Interferon gama
IgG- Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL – Interleucina
IPTG – Isopropil- β -Dtiogalactopiranosídeo
kDa – kilodalton
LABIMUNO - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular
LB - Luria-Bertani
LC- Linfadenite Caseosa

LC/MS – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa

LGCM – Laboratório de Genética Celular e Molecular – UFMG

M1- Macrófagos ativados pela via clássica

M2 – Macrófagos ativados por via alternativa

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg - Miligrama

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MIF – Geométrica da Intensidade de Fluorescência

min- Minuto

mL - Mililitro

mM – Milimolar

MQD- Meio Sintético Quimicamente Definido

MS – Espectrometria de Massa

NaCl – Cloreto de sódio

Nanh – Neuramidase H

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

Nm – Nanômetro

Nº - Número

OPD – Ortofenilenodiamina

OPG – Ovos por grama de fezes

Opp - Transportadores de peptídeos

P. fluorescens – *Pseudomonas fluorescens*

PAI – Ilhas de Patogenicidade

PAMP – Padrão Molecular Associado ao Patógeno

Pb – Pares de bases

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PBS-T – Tampão Fosfato Salino com Tween 20

PCR – Proteína C Reativa

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Percoll – Sílica coloidal revestida por polivinilpirrolidona

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI – Pós Inoculação

PIB- Produto Interno Bruto
PknG – Proteína-cinase
PLD- Fosfolipase D
PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal
PPD – Derivado Proteico Purificado
PWM - Mitógeno *Pokeweed*
RAST (*Rapid Annotation Using Subsystem Technology*)
rCP – Recombinante *Corynebacterium pseudotuberculosis*
rCP40 – Recombinante Serina Protease Corinebacteriana 40
RDW – Amplitude de Distribuição de Glóbulos Vermelhos
RNA – Ácido Ribonucleíco
ROC – Curva Operacional Relativa
ROS – Derivados Reativos do Oxigênio
RPM – Rotação por Minuto
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute Medium*
RpoB – gene subunidade beta da RNA polimease
rRNA – RNA ribossomal
S- Segundo
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB- Soro Fetal Bovino
SOD – Superóxido dimutase
SodC – Superóxido dismutase
Sp – Uma Espécie do Gênero
SpaC – proteína de biossíntese de subtilina
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences
SRD – Sem Raça Definida
TCC – Teste Cervical Comparativo
TGF- β – Fator Transformador de Crescimento β
TGO – Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP – Transaminase Glutâmico-Piruvico
Th1 – Linfócito T helper tipo 1

Th2 – Linfócito T helper tipo 2

TMB - Tetrametilbenzidine

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TPP – Partição em Três Fases

tRNA – RNA transportador

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVASF – Universidade Federal do Vale do São Francisco

V/V– Volume/Volume

VGM – Volume Globular Médio

WB – *Western Blotting*

Δ B – Tuberculina Bovina

Δ V - Tuberculiana Aviária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. Importância da caprino-ovinocultura	25
2.2. Linfadenite Caseosa e seus impactos	26
2.3. Etiologia e aspectos epidemiológicos	28
2.4. Patogenia e fatores de virulência.....	30
2.5. Resposta imune a <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	32
2.5.1. Macrófagos	33
2.6. Biofilme	34
2.7. Proteômica da <i>C. pseudotuberculosis</i>	36
2.8. Proteínas GTPases Rab	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. Geral	40
3.2. Específicos	40
4. CAPÍTULO I: ESTUDO DE GENÔMICA COMPARATIVA DE CEPAS DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> PRODUTORES E NÃO PRODUTORES DE BIOFILME	42
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Cepas de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	45
2.2. Extração do DNA genômico.....	45
2.3. Sequenciamento	46
2.4. Montagem.....	46
2.5. Anotação e depósito	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4. CONCLUSÕES	52
5. REFERÊNCIAS	52
5. CAPÍTULO II: SELEÇÃO E EXTRAÇÃO DE MOLÉCULAS DE CEPAS DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> PRODUTORES E NÃO PRODUTORES DE BIOFILME	56
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS	58

2.1. Local do experimento.....	58
2.2. Cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	59
2.3. Cultivo.....	59
2.4. Extração de componentes somáticos hidrofóbicos com solvente orgânico	59
2.5. Caracterizações da aplicabilidade dos Antígenos de superfície em sistema de ELISA indireto.....	60
2.6. Análise do perfil eletroforético.....	60
2.7 Caracterização do perfil eletroforético e do reconhecimento antigênico por IgG.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4. CONCLUSÃO	67
5. REFERÊNCIAS	68
6. CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO CLÍNICA E HEMATOLÓGICA EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM CEPAS DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> PRODUTORES E NÃO PRODUTORES DE BIOFILME	71
1. INTRODUÇÃO.....	73
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1. Comissão de Ética no Uso de Animais.....	74
2.2. Local do experimento.....	74
2.3. Cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	74
2.4. Cultivo bacteriano de isolados e contagem de células para inoculação em caprinos.....	74
2.5. Caprinos.....	75
2.6. Hemograma.....	76
2.7. Estatística.....	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4. CONCLUSÕES	84
5. REFERÊNCIAS	85
7. CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM CEPAS DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> PRODUTORA E NÃO PRODUTORA DE BIOFILME	87

1.INTRODUÇÃO	89
2. MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1. Comissão de Ética no Uso de Animais	90
2.2. Local do experimento.....	90
2.3. Cepas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	90
2.4. Cultivo bacteriano de isolados e contagem de células para inoculação em caprinos	90
2.5. Cultivo bacteriano para preparo de antígeno BHI	91
2.6. Extração de componentes somáticos hidrofóbicos com solvente orgânico.....	91
2.7. Produção de antígeno secretado concentrado pelo método de partição de três fases (TPP).....	92
2.8. Produção de antígenos secretados em meio sintético quimicamente definido (MQD)	92
2.9. Produção de proteínas recombinantes de <i>C. pseudotuberculosis</i> em <i>E. coli</i>	93
2.9.1. Avaliação das proteínas recombinantes.....	94
2.10. Caprinos	94
2.11. Colheita de sangue	95
2.12. Caracterizações da aplicabilidade dos Antígenos de superfície em sistema de ELISA indireto.....	96
2.13. Caracterização do perfil eletroforético e do reconhecimento antigênico por IgG.....	96
2.14. Quantificação da produção <i>in vitro</i> de IFN- γ por células sanguíneas ...	97
2.15. Teste de tuberculização – Teste Cervical Comparativo (TCC)	97
2.16. Estatística	98
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4. CONCLUSÕES	115
5. REFERÊNCIAS	115
8. CAPÍTULO V: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS GTPASES RAB 5 E RAB 7 A PARTIR DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM CEPAS DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> PRODUTORAS E NÃO PRODUTORAS DE BIOFILME	120

1. INTRODUÇÃO	122
2. MATERIAL E MÉTODOS	123
2.1. Comissão de Ética no Uso de Animais	123
2.2. Grupos experimentais e coleta de amostra	123
2.3. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e derivação dos macrófagos.....	124
2.4. Cultivo bacteriano dos isolados e contagem de células para infecção dos macrófagos.....	124
2.5. Infecção de macrófagos.....	125
2.6. Análise da Expressão das GTPases Rab 5 e Rab 7.....	125
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
4. CONCLUSÕES	134
5. REFERÊNCIAS	134
CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
PERSPECTIVAS	137
REFERÊNCIAS GERAIS	138
ANEXO I Certificado de autorização da CEUA-ICS.....	153

1. INTRODUÇÃO GERAL

O agronegócio brasileiro é um importante segmento econômico, responsável por grande parte do Produto Interno Bruto (PIB). A caprino-ovinocultura é uma área que vem apresentando um forte crescimento no Brasil nas últimas décadas, sendo que a região Nordeste concentra o maior rebanho nacional. Mesmo com esta expansão, ainda existem diversos problemas que impedem um maior desenvolvimento da produção. Esses fatores são em sua maioria, nutricionais e de manejo sanitário (MAPA, 2016).

As enfermidades que acometem os caprinos e ovinos causam diversos prejuízos econômicos, sendo a Linfadenite Caseosa (LC) uma das principais. Esta é uma enfermidade contagiosa, cuja característica mais importante é a presença de granulomas cutâneos e viscerais. No Nordeste brasileiro, a doença possui uma alta prevalência, em especial no Submédio do Vale do São Francisco onde foi observada uma grande ocorrência de lesões características de LC em caprinos e ovinos em propriedades rurais e no abatedouro de Petrolina-PE e Juazeiro-BA, este fato pode estar associado à deficiência no manejo sanitário em geral, bem como falta de medidas de controle da doença (Sá et al., 2013).

A distribuição mundial desta doença, trazendo impacto negativo ao agronegócio, bem como a dificuldade do tratamento e a ausência de vacinas eficazes, justificam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico desta doença (SOUZA et al., 2011). Essa bactéria Gram positiva, pleomórfica em forma de bastonetes, não formadora de esporos e intracelular facultativa, sendo que sua patogenia está relacionada com a presença de genes de virulência, a exemplo da produção da toxina fosfolipase D (PLD), sendo o seu principal fator de virulência já estudado (HODGSON et al., 1999; MEYER et al., 2002).

Além da PLD, outros fatores de virulência deste patógeno já foram estudados, como os genes *fag A, B, C e D*, bem como a produção de biofilme (SÁ et al., 2013a). O biofilme é uma intrincada rede multicelular formada por microcolônias aderentes e rodeadas por uma matriz de polissacarídeos que protege as bactérias contra agentes externos e fagócitos, permitindo sua sobrevivência em ambientes hostis (CHAI et al., 2008; SYAL., 2017). Ressalta-se ainda, que os biofilmes sésses podem

suportar a resposta imune do hospedeiro, principalmente à fagocitose (COSTERTON et al., 1999).

A fagocitose é a primeira linha de defesa contra infecção de bactérias intracelulares. Assim, o fagossomo contendo o patógeno sofre fusões com vesículas endocíticas que culminam na junção fagossomo-lisossomo. Nesse sistema de fusões, o transporte vesicular é constituído por várias proteínas, entre elas as GTPases, enzimas hidrolases que se ligam e hidrolisam o GTP (BHUIJN; ROY, 2014). As Rabs são proteínas, membros da família de GTPases, fundamentais para a fagocitose. Elas fazem parte do sistema de transporte de vesículas e são recrutadas sequencialmente para regular a etapa ao longo da fagocitose. As Rabs são a maior família de proteínas que participam do tráfego de organelas (YEO et al., 2015).

Nesse contexto, onde as GTPases são essenciais para a sobrevivência de bactérias intracelulares, é importante também avaliar e comparar a ação destas enzimas nas cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme, visto que o biofilme é um importante fator de resistência dessas bactérias e pode interferir na fagocitose do micro-organismo. Além disso, é importante conhecer os fatores de virulência do biofilme e assim, poder selecionar novos alvos vacinais (FRATTI et al., 2001; SPANO; GALÁN, 2017).

A seleção de proteínas candidatas como alvos vacinais para a Linfadenite Caseosa é de extrema importância para o controle e disseminação da doença. As vacinas até o momento desenvolvidas são compostas por células bacterianas mortas (as bacterinas), células bacterianas vivas atenuadas, pela toxina inativada (os toxóides) da *C. pseudotuberculosis*, ou pela associação destes componentes, utilizando, ou não, algum tipo de adjuvante (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016; MEYER et al., 2002; VALE et al., 2003). Algumas já existem disponíveis no mercado, porém não fornece a eficácia necessária, sendo preciso um reforço anual, o que torna dispendiosa a profilaxia (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016).

Considerando que poucos antígenos vacinais são conhecidos atualmente, a caracterização de novos é essencial para o desenvolvimento de novas vacinas ou para o imunodiagnóstico. Geralmente promissores alvos vacinais, são os antígenos relacionados com a virulência da bactéria e que são expressos durante a infecção (SOARES et al., 2012). Desta forma, o presente estudo aborda diferentes aspectos

entre cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme, buscando fornecer subsídios que possam contribuir para o aprimoramento de vacinas e diagnóstico desta enfermidade dos pequenos ruminantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância da caprino-ovinocultura

A caprino-ovinocultura é amplamente distribuída em todo o mundo, principalmente em regiões semiáridas, já que caprinos e ovinos são amplamente adaptados a diferentes climas e podem ser criados em diferentes sistemas, em relação a outros animais, como por exemplo os bovinos, requerem menos alimentos. No entanto, a criação destes animais ainda é negligenciada pela política agrícola, como um importante fator contribuinte para a economia de subsistência rural e da periferia urbana (FAO, 2009).

No Brasil esse ramo da pecuária é de extrema importância, principalmente para os pequenos produtores, especialmente na região do Nordeste onde o efetivo de pequenos ruminantes ultrapassa vinte milhões de cabeças e sua principal atividade é a comercialização da carne e leite, que faz parte da cultura gastronômica do nordestino (ANDRADE et al., 2012; PEDROSA et al., 2003).

Para o agronegócio, a criação de caprinos e ovinos possui características peculiares, pois garante índices produtivos em ambientes muitas vezes inóspitos (SAMPAIO et al., 2009). Ainda como fator importante para sua expansão, apresentam maiores taxas de sobrevivência sob condições de seca em relação a outros (RENAUDEAU et al., 2012), bem como suas taxas reprodutivas com alta frequência de nascimentos múltiplos. Como cultura de subsistência, além da carne, a pele e a produção de leite são de grande importância. Assim, são necessárias cada vez mais intervenções que melhorem a produtividade de ovinos e caprinos para elevar o padrão social e econômico de pequenos produtores (HALDAR et al., 2014).

O aumento da procura por produtos derivados da caprino-ovinocultura está associado a níveis mais elevados de rendimento disponível e um aumento de sofisticação entre os consumidores. Assim, a segurança alimentar é um fator

preponderante, bem como a acessibilidade a esses produtos e a diversidade de alimentos (LIU et al., 2012). Além disso, é importante apontar outro aspecto que é a sustentabilidade do setor, que envolve pequenos produtores no planejamento e gestão dos serviços, abrangendo diversos segmentos, a exemplo da utilização do esterco e urina que podem ser usados para melhorar a fertilização do solo, aumentando a produção de húmus (FAO, 2012). Essa melhora produz mais pastagens e conseqüentemente os caprinos e ovinos têm um melhor desempenho, contribuindo para o abastecimento do mercado local e nacional, o que minimiza as importações e aumenta a indústria de transformação dos produtos pecuários, como processamento do leite e seus derivados, além da venda de animais vivos (FAO, 2012).

O setor vem se fortalecendo e a demanda por produtos cárneos tem incentivado a sua profissionalização, que ainda tem como característica a informalidade e o abate clandestino. Nos últimos anos tem ocorrido uma melhoria na organização na cadeia de produção que compreende a criação, abate e distribuição dos produtos (MAPA, 2016). A manutenção dos animais em um estado saudável é um fator importante para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva. A saúde animal é um aspecto crucial da produção, que também pode trazer implicações para a saúde humana (FAO, 2012).

Assim, para atender um mercado consumidor cada vez mais exigente, os frigoríficos estão sendo orientados a implantar vários tipos de controle de qualidade, estabelecendo diversos sistemas de monitoramento de desempenho em busca de carnes cada vez mais saudáveis (GUEDES et al., 2012).

2.2. Linfadenite Caseosa e seus impactos

A Linfadenite Caseosa (LC), popularmente conhecida como mal do caroço, cujo patógeno é *Corynebacterium pseudotuberculosis*, uma doença crônica infecciosa, caracterizada pela formação de granulomas, que afeta especialmente os pequenos ruminantes como caprinos e ovinos, mas é também descrita em outras espécies animais, como equinos, bovinos, suínos, cervos e animais de laboratório. O micro-organismo também já foi isolado em búfalos como doença de pele edematosa,

em veados, porco espinho, lhamas e camelos (SELIM et al., 2016) e em humanos (TROST et al., 2010).

A LC em pequenos ruminantes tem distribuição cosmopolita, com predominância em locais de tradição na caprinocultura como Austrália, África, alguns países da Europa e na América, principalmente no Brasil (IBTISAM, 2008; MAHMOOD et al., 2016; WILLIAMSON, 2001).

Caracteriza-se por processo inflamatório de linfonodos, com formação de granulomas de aspecto caseoso e esbranquiçado. A doença se inicia com o aumento do volume dos linfonodos, que com sua evolução, tornam-se flutuantes. Os mais frequentemente acometidos são os pré-parotídeos e pré-escapulares, podendo ocorrer granulomas em linfonodos internos como os mediastínicos, causando quadros respiratórios como tosse crônica (RIBEIRO, 1997).

O contágio envolve pele e mucosa afetada, seguido pela disseminação de bactérias livres ou dentro de fagócitos, levando à infecção nos gânglios linfáticos e quando na sua forma mais agressiva podem afetar os órgãos internos, principalmente os pulmões (SEYFFERT et al., 2014; WILLIAMSON, 2001). Uma vez estabelecida, a doença se torna crônica e persiste pela vida do animal, disseminando para todo o rebanho (BAIRD; FONTAINE, 2007). Nos casos crônicos com lesões viscerais, o animal, apresenta anemia e hipoproteinemia. Internamente os granulomas são encontrados principalmente nos linfonodos bronquiais e mediastínicos e nos pulmões. Estes granulomas podem ser localizados em qualquer sistema do organismo (DORELLA et al., 2006).

A LC é responsável por perdas econômicas significativas na caprino-ovinocultura. Em feiras e exposições, os animais acometidos pela doença são excluídos de julgamentos e comercialização. Esta enfermidade compromete a pele do animal, chegando a perdas de 40% do seu valor, carcaça e órgãos internos. Na sua forma visceral é assintomática, sendo diagnosticada apenas quando os animais são abatidos, causando condenação de carcaças (SOUZA et al., 2011).

Além disso, quando o rebanho possui grande incidência da doença, os animais apresentam caquexia progressiva, anemia, hiperplasia dos linfonodos superficiais e dispnéia. Em ovelhas é comum a disseminação para linfonodos mamários, causando queda na produção leiteira. Ainda nestes animais esta infecção afeta a produção de lã, reduz a eficiência reprodutiva com a diminuição da taxa de

natalidade, gerando baixa produtividade, principalmente nos produtores de pequeno porte e pouco tecnificados (BAIRD; FONTAINE, 2007; PIONTKOWSKI; SHIVVERS, 1998; SOUZA et al., 2011).

Dessa forma, além do significativo prejuízo para a cultura de subsistência, a LC é um problema para a indústria de ovinos e caprinos, pois limita a rentabilidade. Além disso, as medidas de manejo sanitário são fundamentais para melhorar o controle da doença e reduzir os elevados percentuais de prevalência, associadas ao desenvolvimento e aplicação de um diagnóstico eficaz e de baixo custo, bem como a produção de vacinas também de baixo custo, capazes de prevenir e controlar a doença em caprinos e ovinos (ALVES et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2011).

2.3. Etiologia e aspectos epidemiológicos

C. pseudotuberculosis, agente etiológico da LC, foi descrito por Nocard em 1888, a partir de um caso de linfagite bovina. Sua nomenclatura atual foi adotada em 1948, na 6ª edição do Bergey's Manual. Porém anteriormente eram denominados de *Corynebacterium ovis*.

C. pseudotuberculosis pertence ao grupo CMNR (Gêneros: *Corynebacterium/Myco bacterium/Nocardia/Rhodococcus*), patógenos intracelulares facultativos (DORELLA et al., 2006). São bactérias Gram-positivas pleomórficas, pequenas, irregulares, que aparecem em formas cocóides, clavadas ou bacilos, imóveis, aeróbicas, fermentativas e não formadoras de esporos. Em esfregaços corados, aparecem isoladas, em paliçadas de células paralelas e em grupos angulares semelhantes a letras chinesas. Em meio de cultura ágar-sangue apresenta-se em forma de colônias pequenas, esbranquiçadas rodeadas por zona estreita de hemólise completa, medindo 0,5 a 0,6 µm por 1 a 3 µm. Sua virulência, dentre outras, está relacionada aos lipídeos de sua parede celular e a produção de uma exotoxina, a fosfolipase D (PLD) (QUINN, et al., 2005).

Esse patógeno possui dois biovar: *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*, agente etiológico da linfadenite caseosa em pequenos ruminantes e *C. pseudotuberculosis* biovar *equi*, que causa linfagite ulcerativa em equinos, mastite em bovinos e doença de pele edematosa em bubalinos (BAIRD; MALONE, 2010; SELIM et al., 2016). A diferença entre os dois biovars é demonstrada através do teste bioquímico de

redução de nitrato a nitrito, sendo o biovar *equi* nitrato positivo e o *ovis* negativo (DORELLA et al., 2006).

No seu estágio inicial, *C. pseudotuberculosis* infecta os macrófagos e multiplica-se dentro deles. Como é intracelular facultativa, esta bactéria é capaz de sobreviver e crescer em macrófagos e de evadir à ação do sistema imunitário do hospedeiro. A PLD pode ser importante neste processo, permitindo que o organismo permaneça na célula fagocitária, onde catalisa a hidrólise dos fosfolipídeos da membrana celular gerando o ácido fosfatídico. A PLD tem sido associada a uma variedade de funções celulares fisiológicas, como tráfego de proteínas intracelulares e a atividades patológicas (MAHANKALI et al., 2015; TITBALL, 1993).

A transmissão da LC acontece no ambiente pelo contato entre animais saudáveis e doentes, principalmente através do exsudato, aonde o conteúdo permanece na vegetação, nas instalações e no solo por meses (RIET-CORREA et al., 2011). A prevalência desta doença é estudada em muitos países principalmente naqueles que tem a caprinocultura como subsistência. No Egito, pesquisadores encontraram 33,23% e 10,74% para ovinos e caprinos, respectivamente (AL-GAABARY, 2010). Estudos realizados no Nordeste do Brasil mostraram que a LC é a doença de maior prevalência em caprinos e ovinos (SOUZA et al., 2011).

Para diminuir a incidência, existem algumas medidas de controle para a LC, porém a erradicação possui dificuldades, principalmente devido à forma subclínica da doença, e o tratamento com antibióticos não possui eficácia. Assim, medidas profiláticas são indicadas, principalmente no controle da introdução de animais na propriedade, bem como medidas sanitárias adicionais, a exemplo do descarte do animal que ainda é uma estratégia para conter o avanço da doença, embora algumas vezes com grandes perdas devido a alguns animais serem de boa qualidade genética (GUIMARÃES et al., 2011).

Algumas vacinas já estão sendo desenvolvidas, utilizando células bacterianas mortas, vivas e inativadas, com toxóides, utilizando ou não adjuvantes (VALE et al., 2003). Recentemente, vacinas utilizando a tecnologia do DNA recombinante vêm sendo desenvolvidas e têm demonstrado uma boa eficiência, um exemplo é a vacina produzida com a proteína recombinante rCP40 associada à saponina como adjuvante (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016).

2.4. Patogenia e fatores de virulência

A virulência de *C. pseudotuberculosis* está comprovadamente ligada, como já mencionado, aos lipídeos de sua parede celular e à PLD. Nos estágios iniciais de infecção, a produção desses genes de virulência aumenta a sobrevivência e a multiplicação do patógeno (MEYER et al., 2002). A enzima PLD é o principal fator de virulência estudada nas linhagens dessa bactéria. Esta enzima possui ação de exotoxina glicoprotéica ou citotoxina capaz de hidrolisar a esfingomiéline, enfraquecendo as membranas celulares e favorecendo a infecção pelo micro-organismo. Ela catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster dos glicerofosfolipídeos produzindo ácido fosfatídico e outras moléculas hidrofílicas como a serina (QUINN et al., 1994). Além disso, provoca a ruptura dos eritrócitos ovinos em meios de cultura suplementados com sangue. Esse efeito hemolítico da PLD possui sinergismo com a fosfolipase C de *Rhodococcus equi*, possibilitando a confirmação do *C. pseudotuberculosis* pelo teste de hemólise sinérgica (teste de CAMP - QUINN et al., 1994). Muitos estudos sobre a PLD de *C. pseudotuberculosis* já foram realizados, pois é um fator de virulência importante para a patogenicidade do agente (HODGSON et al., 1999; PACHECO et al., 2011).

A PLD aumenta a permeabilidade vascular. Os lipídeos estão ligados à camada de peptídioglicano, estabilizando a membrana externa, contribuindo para a sobrevivência das bactérias dentro das células fagocíticas do hospedeiro, como também são responsáveis pela disseminação da bactéria na infecção primária, que começa com inflamação local, atingindo os linfonodos regionais e formação de granulomas (DORELLA et al., 2006; HODGSON et al., 1992).

Outros genes de virulência também compõe a patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*, os genes *fagA* (proteína integral de membrana), o *fagB* (transportador de enterobactina de ferro), o *fagC* (ATP-proteína de ligação da membrana citoplasmática) e o *fagD* (Sideróforos-proteína de ligação de ferro) constituem um *operon* envolvido em sistemas de absorção de ferro bacterianos que foi identificado a jusante do gene *pld* (BILLINGTON et al., 2002).

O estudo das ilhas de patogenicidade (PAIs) em genomas bacterianos pode auxiliar na identificação de fatores de virulência bacteriana. A presença desses fatores em bactérias patogênicas é indicativa de altas concentrações de genes de

virulência, que pode promover mecanismos de adesão, invasão, colonização e proliferação no hospedeiro além da evasão do sistema imunológico. Sua transmissão horizontal indica que os genes de virulência podem contribuir para o aumento da adaptabilidade das cepas em diferentes hospedeiros. Esta característica foi demonstrada pela descoberta de genes com funções associadas à absorção de ferro, carbono e magnésio, uma vez que esta absorção aumenta a sobrevivência bacteriana em condições de estresse (RUIZ et al., 2011).

Outros fatores moleculares associados à virulência do *C. pseudotuberculosis* são os transportadores de peptídeos (Opp), que consiste em complexos de subunidades de proteínas e pertencem à família ABC, que utiliza a energia gerada da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) para transportar lipídeos, peptídeos e sacarídeos através da membrana plasmática. Suas funções estão relacionadas com a captação de peptídeos extracelulares, que envolve a nutrição e regulação da célula (MORAES et al., 2014).

Em bactérias Gram-positivas, o mecanismo de comunicação celular que regula os fatores de nutrição, virulência entre outros fatores, são mediados por peptídeos sintetizados pela própria célula e estão envolvidos no *quórum sensing*, podendo interagir com alguns receptores intracelulares. Essas interações podem favorecer novos modelos de crescimento bacteriano, como esporulação ou formação de biofilmes (RUMJANEK et al., 2004).

Além de peptídeos, existe uma grande quantidade de lipídeos na parede celular de *C. pseudotuberculosis*, estes fatores aumentam a patogenicidade da bactéria. As lipoproteínas são proteínas ancoradas à membrana por ácidos graxos ligados à cisteína. Essas substâncias secretadas por *C. pseudotuberculosis* e a caracterização das proteínas expressas têm mostrado o seu potencial imunogênico e sua resposta imune ao hospedeiro (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016). Bem como, os lipídeos de superfície que são importantes para a virulência do micro-organismo. A camada de lipídeo protege contra enzimas proteolíticas presentes no fagolisossomos, permitindo a disseminação do agente nos tecidos e o desenvolvimento de lesões granulomatosas (BASTOS et al., 2012).

Entre os lipídeos, os ácidos micólicos, importantes ácidos graxos de cadeia longa, embora em *Corynebacterium* estes sejam menores (C22 a C36), desempenham características importantes, incluindo resistência a lesões químicas e

desidratação, baixa permeabilidade a drogas e capacidade de formar biofilmes, bem como a capacidade de persistir no hospedeiro (PAWELCZYK ; KREMER, 2014).

Conhecer esses mecanismos de resistência é fundamental para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes e *kits* de diagnóstico. Várias cepas já foram estudadas a exemplo da 1002 cultivada em meio sintético quimicamente definido (MQD), onde foram identificados alguns fatores de virulência, incluindo a PLD (FALISSE-POIRRIER et al., 2006).

2.5. Resposta imune a *Corynebacterium pseudotuberculosis*

A infecção pelo *C. pseudotuberculosis* começa com a penetração no hospedeiro, que normalmente ocorre através da mucosa oral, nasal e através de feridas cutâneas e sua disseminação ocorre livremente ou dentro de macrófagos, através do sistema linfático aferente aos linfonodos locais e alguns órgãos internos e viscerais. Algumas células são carregadas logo após a infecção, principalmente neutrófilos e posteriormente por macrófagos. Essas células fazem parte do mecanismo de ação da resposta imune inata, ocorrendo nos primeiros dias da infecção sinalizações para o desenvolvimento da resposta adaptativa. Depois, ocorre o desenvolvimento de granuloma e caracterização da maturação e persistência do granuloma, que libera novas bactérias e causa necrose (BASTOS et al., 2012; PÉPIN et al., 1997).

Os granulomas são formas de inflamação, onde sua formação é uma resposta imune inata para separar substâncias insolúveis evitando a propagação para outro local. Eles possuem resposta linfocitária associada com a arquitetura e organização e mostra que as subpopulações presentes desempenham funções significativas no processo da doença. A polarização de macrófagos é um importante mediador na formação de granulomas. Os macrófagos com MHC classe I ativados, estimulam os macrófagos MHC classe II, ligando a receptores *Toll-like* e IFN- γ , promovem uma resposta Th1. Os marcadores de células T, CD4 e CD8 são distribuídos pela camada linfoide. Esse tecido linfoide intracapsular pode conter elevada proporção de linfócitos T e atipicamente algumas células B, que podem produzir anticorpos que neutralizam a PLD e os lipídeos citotóxicos (MARINO et al., 2015; WALKER et al., 1991).

A imunidade contra *C. pseudotuberculosis* envolve respostas imunes celulares e humorais. Por ser de natureza intracelular facultativa, possui uma maior resposta imune celular, onde as células T produzem IFN- γ e outras citocinas importantes para o controle da infecção. Na resposta imune humoral, observa-se que a partir de 6 a 11 dias de infecção, a produção de anticorpos é importante para evitar a disseminação da bactéria, a presença de citocinas como IFN- γ como resposta primária é importante para evitar a propagação do agente. E a partir do dia 16 uma forte resposta secundária até diminuir dos dias 42 para 56 dias de infecção (PAULE et al., 2003).

Alguns fatores de virulência, entre eles a PLD e lipídeos citotóxicos aumentam a patogenicidade da doença. As células fagocíticas englobam *C. pseudotuberculosis*, formando o fagolisossomo. Por ser um patógeno intracelular facultativo, algumas bactérias sobrevivem dentro de macrófagos, já que algumas células não produzem óxido nítrico em resposta ao micro-organismo. Essa não produção de óxido nítrico pode estar associada á camada lipídica da parede celular do agente (STEFANSKA et al., 2010).

2.5.1 Macrófagos

O macrófago é uma importante célula do sistema imunitário, proveniente da linhagem mieloide do sistema hematopoiético, tendo como precursor o monócito (GEISSMANN et al., 2010). É a principal célula do sistema fagocitário mononuclear e constitui um dos principais componentes do sistema imune inato contra micro-organismos, através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) que interagem com receptores específicos (MURRAY; WYNN, 2012).

Quando ativados apresentam diversas funções, como atividade metabólica e fagocítica, tendo maior capacidade de endocitose. Na ativação, convertem o oxigênio em derivados reativos do oxigênio (ROS), que destroem os micro-organismos. Os macrófagos estão envolvidos na reparação tecidual, pois quando ativados produzem fatores de crescimento para fibroblastos e células endoteliais que participam na remodelagem dos tecidos, remoção de células lesadas, estando envolvidos em todas as fases da resposta imune (WYNN; BARRON, 2010).

Os macrófagos apresentam papel de destaque na patogenicidade da infecção por *C. pseudotuberculosis*, fornecendo um nicho intracelular para a sobrevivência e multiplicação do patógeno, onde ocorre a evasão do sistema imune por inibição da formação do fagolisossomo, resultando em multiplicação da bactéria e morte celular. Porém estudos mostram que a fagocitose do agente pode variar de acordo com a cepa (STEFÁNSKA et al., 2010).

Quando ativados classicamente são chamados de M1, participando da resposta imune Th1. Essa ativação pode ocorrer na presença de IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF), estimulando a fagocitose para eliminar o patógeno. Na ativação alternativa, células M2 referem-se a várias formas de macrófagos, após exposição a IL-4, IL-13 e IL-10. As células M2 produzem citocinas inflamatórias em menores níveis, secretam moléculas anti-inflamatórias como TGF- β , induzindo resposta imune Th2, diminuindo a fagocitose e capacidade de eliminar o patógeno (JENKINS et al., 2011).

2.6. Biofilme

Estudos anteriores demonstram que os micro-organismos têm normalmente uma capacidade de adesão em superfícies, onde se multiplicam dentro de uma matriz de autoprodução composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que são constituídas de polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, formando seu ambiente e constituindo o biofilme. Esse desenvolvimento do biofilme é dinâmico e complexo (XIANG et al., 2014).

Assim, o biofilme é um agregado organizado de micro-organismos dentro de uma matriz polimérica extracelular, composta parcialmente de proteínas, circundadas por alguns nutrientes tais como polissacarídeos, minerais importantes e essencialmente água, com um teor em torno de 97%, que promove o fluxo de nutrientes (LU; COLLINS, 2007).

A maioria dos micro-organismos vive dentro de um ecossistema estruturado por biofilmes e não em vida livre. A formação de biofilme é um mecanismo de defesa que assegura a sua sobrevivência em ambientes adversos - são amplamente definidos como conjuntos de micro-organismos que se comunicam, empregando a detecção do quórum sensing e seus produtos extracelulares associados a uma

interface ligados a superfície biótica ou abiótica. A formação de microcolônias envolta por EPS desenvolve-se promovendo uma agregação bacteriana, formando biofilmes com formas reversíveis e irreversíveis (ISHIDA et al., 2011; XIANG et al., 2014).

Estudos genéticos mostram que a formação de biofilme, ocorre em várias etapas, sendo cada etapa sinalizada pelo quorum sensing entre as células do micro-organismo. Inicia-se pela adesão, seguido de uma formação de agregados moleculares que sofre maturação para formar a arquitetura do biofilme, depois se desprende dispersando o biofilme (SHAW et. al., 2004). Essa formação prossegue através desses estágios de desenvolvimento que são programados e distintos, sinalizados por uma população constituinte e seu meio ambiente. Observa-se um fator importante que é o nível de tolerância a uma variedade de estresses (RICHARDS; OJHA, 2014).

Os EPS promovem interações intensas, incluindo comunicações de célula-célula e a formação de associações sinérgicas. É gerado um sistema digestivo externo devido à retenção de enzimas extracelulares, que sequestra e dissolve nutrientes em partículas da fase aquosa, que são utilizadas como fonte de nutrientes e energia. A matriz protege os organismos contra a dissecação, cátions metálicos, radiação ultravioleta entre outros (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Infecções relacionadas com o biofilme normalmente representam enormes desafios para a saúde pública, devido a sua capacidade de resistência a fármacos. No hospedeiro, os biofilmes são fatores que protegem os patógenos das defesas do sistema imunológico, e também oferecem proteção contra os desafios mecânicos e químicos (FALKINHAM, 2007).

Algumas substâncias são utilizadas pelo biofilme para aumentar a sua resistência. No *Mycobacterium smegmatis*, o biofilme aumenta o sequestro de ferro que induzem a expressão de transportadores, como bomba de efluxo (OJHA; HATFULL, 2007).

O biofilme em *C. pseudotuberculosis* forma uma matriz complexa de polissacarídeos e outros agregados que pode aderir em superfícies orgânicas ou inorgânicas, além de manter a bactéria protegida, aumentando a sua resistência contra agentes externos (COSTERTON et al., 1995). Para entender melhor essa dinâmica de agregados moleculares, Ojha et al. (2008), afirmaram que bactérias

intracelulares, como as micobactérias, além de possuir toda a estrutura de um biofilme comum, também podem desenvolver outras estruturas na interface, já que essas bactérias possuem diferentes composição da matriz extracelular do biofilme, principalmente pela presença de níveis elevados de lipídeos.

Os mecanismos de resistência utilizados pelo biofilme são aqueles que compõem o seu agregado molecular, a saber, o glicocálice, uma estrutura flexível que regula o crescimento do biofilme usando a eletrostática unindo forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, promovendo a adesão e coesão do biofilme, auxiliando na maturação do biofilme (SUTHERLAND, 2001). Enzimas que degradam substâncias tóxicas como compostos fenólicos e metais pesados também proporciona a defesa do biofilme (KÜMMERLE et al., 1996).

A resposta ao estresse provocado por essas substâncias funciona como um fator preventivo. Alguns genes estão relacionados a essa resposta, o gene RpoS, uma subunidade dos fatores sigmas. Esse mesmo fator pode controlar outros genes que determinam a tolerância ao estresse, enquanto outras regulam o rearranjo fisiológico na bactéria em condições de estresse. Essa resposta pode resultar em aumento da resistência a ação de biocidas (TRIVEDI et al., 2015).

Entender o dinamismo de como bactérias planctônicas forma o biofilme, pode elucidar o seu mecanismo molecular de patogenicidade e resistência (XIANG et al., 2014). Identificar e inibir os genes responsáveis pela formação de biofilme é a abordagem mais efetiva para minimizar a resistência nos biofilmes bacterianos que provoca varias perdas econômicas, quer seja na saúde humana, animal e na indústria (FALKINHAM, 2007; TRIVEDI et al., 2015).

2.7. Proteômica da *C. pseudotuberculosis*

O conhecimento do proteoma bacteriano pode fornecer informações de diversos fatores e mecanismos envolvidos nos processos fisiológicos e bioquímicos que caracterizam especificidades de cada bactéria. Esses estudos podem envolver desde o desenvolvimento de meios ou condições de cultivo para melhorar a síntese de aminoácidos até a purificação de moléculas antigênicas com alto potencial para o desenvolvimento de medicamentos ou vacinas (SILVA et al., 2013).

Apesar da importância econômica da LC, *C. pseudotuberculosis* tem poucos genes de virulência caracterizados, porém vários estudos já foram desenvolvidos e algumas proteínas já foram descobertas como chaperonas, serina-proteases, transportadoras de ferro, permeases de oligopeptídeo, proteínas ligadas à resposta ao estresse oxidativo que estão envolvidas com a patogenicidade da bactéria e estão associados à adesão, invasão celular, sobrevivência e proliferação na célula hospedeira. Há ainda, outras proteínas que são responsáveis pela síntese da parede celular e que participam de processos fisiológicos no crescimento bacteriano (MORAES et al., 2014; PACHECO et al., 2011; REES et al., 2015; SEYFFERT et al., 2014)

O estudo proteômico de duas cepas bacterianas de *C. pseudotuberculosis* (Cp 1002 e Cp C231), identificaram respectivamente, 55 e 45 proteínas extracelulares e de membrana, das quais 29 são comuns às duas cepas e observaram que existem diferenças no exoproteoma de ambas, o que pode influenciar na patogênese, antigenicidade e adaptação específica de cada isolado (SILVA et al., 2013).

As diferenças observadas podem ser explicadas por se tratar de uma cepa caprina e outra ovina e também por serem de diferentes localizações geográficas: a Cp 1002 foi isolada de caprino no Brasil e a Cp C231 foi isolada de ovino na Austrália. Outra diferença primordial é a ausência da fosfolipase D (PLD) e serina protease corinebacteriana (Cp40) na cepa Cp 1002, o que pode influenciar diretamente na patogênese da cepa bacteriana (HODGSON et al., 1992; PACHECO et al., 2011). Estudos de proteômica de *C. pseudotuberculosis* representam uma estratégia eficiente para a caracterização de proteínas bacterianas, pois novas proteínas identificadas contribuem para a validação *in silico*.

Novamente, a proteína PLD catalisa a hidrólise dos fosfolípidos da membrana celular gerando o ácido fosfatídico. Ainda hidrolisa fosfatidilcolina e esfingomiélinas nas membranas celulares de mamíferos, o que resulta na formação de colina e ceramida fosfato. Possui um fator de permeabilidade que promove a disseminação do patógeno do local de infecção para outros órgãos do hospedeiro, causando a dermonecrose das células endoteliais (SONGER, 1997). Além disso, a PLD tem sido associado com várias funções celulares, entre elas o tráfego de

proteínas intracelulares, remodelação da membrana e proliferação celular (MAHANKALI et al., 2015).

Outras proteínas também já foram caracterizadas a exemplo da serina protease corinebacteriana (Cp40), uma proteína de 40 kDa de *C. pseudotuberculosis* desenvolvendo-se como uma promissora candidata à vacina (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016). Porém, Shadnezhad et al., (2016), apresentam evidências de que a Cp40 não é uma serina protease, mas uma endoglicosidase com atividade imunológica de proteína hospedeira. Outro estudo mostra que a Cp40 tem importância relevante na proteção contra a infecção, portanto pode auxiliar no desenvolvimento contínuo de vacinas para combater a infecção por *C. pseudotuberculosis* (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016).

Além da Cp40, outras proteínas de *C. pseudotuberculosis* já foram estudadas e identificados com potencial antigênicos. Estes resultados foram encontrados em estudos do genomas de algumas cepas (HANSSAN et al., 2014; SANTANA-JORGE et al., 2016; SANTOS et al., 2012). Entre outras proteínas estudadas pode-se mencionar as proteínas SpaC, NanH, SodC, e PknG que certamente apresentam um papel importante na virulência e patogenicidade da doença e que, de acordo com a sua caracterização *in silico*, são alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas para a LC (SANTANA-JORGE et al., 2016). A proteína SpaC, caracterizada como uma provável adesina, sendo reconhecida como um fator de virulência importante na adesão da bactéria ao tecido hospedeiro (ROGERS et al., 2011). A NanH, uma provável neuraminidase, têm sido reconhecida em algumas bactérias patogênicas como um fator de virulência, contribuindo para o reconhecimento na superfície da célula hospedeira (KIM et al., 2011). Já a SodC, uma enzima superóxido dismutase com localização extracelular, pode atuar protegendo a superfície da bactéria da ação de superóxidos produzidos pela célula hospedeira (TROST et al., 2010). E a proteína PknG, mesmo que ainda sem uma função conhecida no genoma de *C. pseudotuberculosis*, a mesma faz parte de uma classe de moléculas responsáveis por inúmeras funções essenciais a célula (PEREIRA et al., 2011), e já foi caracterizada no *M. tuberculosis* como tendo capacidade de inibir a formação do fagolisossoma (WALBURGER et al., 2004). Ainda de acordo com a análise *in silico*, estas proteínas além de estarem envolvidas na virulência e patogenicidade da doença também apresentam vários epítomos de células B e T, sugerindo que as

mesmas possam ser importantes alvos vacinais capazes de induzir uma resposta imune completa contra o *C. pseudotuberculosis* (SANTANA-JORGE et al., 2016).

Várias tecnologias estão sendo utilizadas para a caracterização de proteínas. A espectrometria de massa (MS) trouxe novas perspectivas para o estudo das proteínas bacterianas. Para melhor analisar o proteoma de *C. pseudotuberculosis*, Pacheco et al. (2011), realizaram um estudo com cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), onde a caracterização de várias proteínas foi realizada o que contribuiu para o aumento do banco de dados proteômicos dessa bactéria, sendo que novos determinantes moleculares de virulência foram catalogados como promissores alvos vacinais.

2.8 Proteínas GTPases Rab

As proteínas Rabs fazem parte da família GTPases e juntas com outras proteínas compõem o sistema de transporte de vesículas, controlando o ancoramento das vesículas nas membranas-alvo, assegurando que a membrana se aloque no sítio ativo correto. Os patógenos bacterianos têm como alvo as funções de Rab para criar um compartimento adequado para a sua replicação em células hospedeiras. Estas pequenas proteínas de ligação regulam vários patógenos. Por isso, é necessário compreender a natureza do compartimento e a localização onde os patógenos estabelecem seus mecanismos de ação sobre o hospedeiro (CLEMENS et al., 2000).

Esse tráfego vesicular regula essencialmente a compartimentalização e abundância de proteínas no interior das células e fornece sinalização em muitas vias da célula. A maioria das Rabs são ubiquamente proteínas e são contribuintes para formação de vesículas. Mutações de Rabs podem afetar o crescimento celular, motilidade e outros processos biológicos (BHUINA; ROY, 2014).

As Rabs também estão envolvidas com a fagocitose de partículas opsonizadas de IgG e desempenham função primordial no tráfego de membranas intracelulares, incluindo fagocitose de células apoptóticas (NAKAYA et al., 2006). A remodelação da membrana nos estágios iniciais da fagocitose permite a absorção de partículas ou patógenos, sendo a Rab GTPase recrutada para regular esse

transito durante o processo da fagocitose. Rab5, Rab7 e Rab11 são responsáveis pela mediação da fusão inicial de endossomos, de reciclagem tardia durante a maturação do fagossomo. Além disso, a isoforma Rab5 tem a função de sinalizar na maturação de fagossomos, recrutando várias enzimas e moléculas efetoras nesse processo (YEO et al., 2015).

A transformação de fagossomos em fagolisossomos envolve a aquisição gradual de marcadores do sistema endossomal. Rab5 regula os eventos de fusão permitindo a conversão do fagossomo precoce para fagossomo tardio. Rab5 é encontrado em endossomos iniciais e tem relação com a maturação de fagossomo contendo patógenos intracelulares, já Rab7 é necessário para eventos de fusão de fagossomos tardios para fagolisossomos (MOTTOLA et al., 2014). Os mecanismos efetores desses receptores não foram elucidados, mas sabe-se que o Rab 5 é um regulador de eventos no trânsito da membrana que envolve estes compartimentos e já foram associados na maturação de macrófagos em camundongos (DESJARDINS et al., 1994). Além disso, Rab5 e Rab7 participam de algumas etapas do processo autofágico, sendo que a Rab5 regula a formação e a Rab7 atua no processo da maturação e no processo de tráfico de autofagosomos e anfissomas, porém dependentes de suas funções endossais (SZATMARI; SASS, 2014). Esses processos são importantes para a regulação da fagocitose de bactérias intracelulares.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- ✓ Determinar a sequência do genoma e avaliar aspectos da resposta imune a cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme, numa infecção experimental de caprinos com estes micro-organismos.

3.2. Específicos

- ✓ Sequenciar o genoma de cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme.

- ✓ Extrair, purificar, quantificar e avaliar os efeitos antigênicos de proteínas de cepas produtoras e não produtoras de biofilme de *C. pseudotuberculosis* isolados de caprinos e ovinos da região do Submédio São Francisco.
- ✓ Comparar a expressão de proteínas nas cepas produtoras e não produtoras de biofilme.
- ✓ Buscar moléculas candidatas para desenvolvimento de testes de diagnóstico da Linfadenite Caseosa.
- ✓ Avaliar hemogramas em caprinos infectados e não infectados por *C. pseudotuberculosis* comparando cepas produtoras e não produtoras de biofilme.
- ✓ Avaliar clinicamente caprinos experimentalmente infectados com cepas produtoras e não produtoras de biofilme.
- ✓ Avaliar a capacidade de modulação da expressão das proteínas endossomais GTPases Rab 5 e Rab 7 por linhagens de *C. pseudotuberculosis* produtora e não produtora de biofilme em infecção *in vitro* de macrófagos caprinos.

4. CAPÍTULO I

ESTUDO DE GENÔMICA COMPARATIVA DE CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PRODUTORAS E NÃO PRODUTORAS DE BIOFILME

RESUMO

O genoma de um micro-organismo é de suma importância, pois ele codifica os genes necessários para compreensão da doença. O sequenciamento do genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* é necessário para a análise de genes que servirá como base para a proteômica dessas mesmas cepas. Dessa forma, este estudo teve o objetivo de caracterizar o genoma de quatro cepas de *C. pseudotuberculosis*, comparando as cepas produtoras de não produtoras de biofilme. Para isso foram selecionadas as cepas isoladas de caprinos (CAPJ4 - forte produtor de biofilme e CAP3W - negativa para produção de biofilme) e duas isoladas de ovinos (OVI2C moderado para formação de biofilme e OVI03 - negativo para produção de biofilme). O sequenciamento foi realizado através da plataforma Illumina HiSeq. A análise da qualidade das reads foi feita no programa FastQC. Na montagem utilizou-se o programa SPAdes versão 3.6 e o Newbler 2.9. O processo de fechamento dos gaps foi feito através do programa CLC *Genomics Workbench*. O genoma da cepa OVI2C encontra-se com tamanho de 2337575 bp em um cromossomo circular, com número de acesso no GenBank CP026374. O genoma da cepa CAP3W encontra-se com 2337498 bp e o seu acesso é CP026500. O genoma da cepa CAPJ4 possui 2337549 bp e o seu acesso é CP026499. O genoma da cepa OVI03 tem 2337541 bp e o seu acesso é CP026524. Depois de analisar a sequência dos genes contidos no genoma, observou-se que cepas de *C. pseudotuberculosis* estudadas possuem uma similaridade gênica, mostrando que seus genes são altamente conservados, embora algumas cepas fossem mais virulentas, como as produtoras de biofilme.

Palavras-chave: Biofilme, caprino, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, genoma, Linfadenite Caseosa.

1. INTRODUÇÃO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria intracelular facultativa, sendo o agente etiológico da Linfadenite Caseosa, doença infecciosa que acometem caprinos e ovinos, responsável por prejuízos na produção devido diminuição de peso corporal, qualidade de pele, além de outras perdas (GUIMARÃES, et al., 2011).

Para minimizar essas ocorrências, vários estudos foram realizados no sentido de prevenir a doença. Alguns testes diagnósticos foram desenvolvidos, bem como a produção de antígenos para o desenvolvimento de vacinas (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016; MEYER et al., 2005; REBOUÇAS et al., 2011). Para melhor compreensão, o genoma de algumas cepas foi caracterizado e vem destacando alguns genes dessa bactéria como responsáveis pela expressão de possíveis fatores de virulência (TROST et al., 2010).

Alguns destes genes foram clonados e suas moléculas expressadas foram testadas, porém com resultados incipientes para produção de vacinas comerciais. Assim, o estudo do genoma é necessário para reunir informações a cerca de novos genes e os produtos de suas expressões, principalmente aqueles comuns a todos os genomas (SANTOS et al., 2012).

Por certo, outros genes permanecem ainda inacessíveis e, talvez esses genes negligenciados possam expressar alvos antigênicos candidatos a constituintes mais eficientes para vacinas ou para o imunodiagnóstico. Assim, é importante ampliar os estudos *in silico*, para novas descobertas nesta direção (TROST et al., 2010). O biofilme é um complexo de aglomerados moleculares que constitui proteção à bactéria. O conhecimento dos genes responsáveis pela sua produção é essencial para a compreensão dos mecanismos que envolvem essa proteção (BELOIN & GHIGO, 2005).

Assim, este estudo objetivou avaliar aspectos do genoma de quatro cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, isoladas de caprinos e ovinos da região de Petrolina-PE, especialmente na comparação entre as produtoras e não produtoras de biofilme, buscando detectar potenciais fatores de virulência através dos genes que regulam sua expressão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cepas de *C. pseudotuberculosis*

Foram selecionados quatro isolados de *C. pseudotuberculosis*, oriundos da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sendo utilizados dois isolados de caprinos (CAPJ4 - forte produtor de biofilme e CAP3W - negativa para produção de biofilme) e dois isolados de ovinos (OVI2C moderado para formação de biofilme, e OVI03 - negativo para produção de biofilme). Em estudos anteriores estes isolados foram identificados e testes de biofilme, bomba de efluxo, bem como presença de genes de virulência *pld*, *fagA*, B, C e D foram realizados (SÁ et al., 2013; SÁ et al., 2013a)

2.2. Extração do DNA genômico

As cepas de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas em 30 mL de BHI (Brain Heart Infusion) por 48 horas a 37 °C. Após o cultivo as mesmas foram centrifugadas e o *pellet* ressuspenso em 0,6 mL de solução I (tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM e NaCl 300 mM). Depois, essa solução foi colocada em tubos com Beads (VK01) e foi realizado dois ciclos de 15s a 6500 rpm com intervalo de 30s. Em seguida foi adicionado fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Homogêinizou e centrifugou por 7 minutos a 13000 rpm. Coletou o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de fenol, homogêinizou e centrifugou por 7 minutos a 13000 rpm. Em seguida adicionou 1 mL de clorofórmio, homogêinizou-se e centrifugou por 7 minutos a 13000 rpm. Coletou o sobrenadante e adicionou-se 2,5 volume de álcool etílico, 10% do vol. De NaCl 5 M e 1% glicogênio (20mg/mL). Foi precipitado no freezer, depois centrifugou por 15 minutos a 13000 rpm. Retirou o sobrenadante e adicionou 1 mL de álcool 70% gelado. Depois deixou no freezer por 15 minutos, centrifugou-se por 20 minutos a 13000 rpm. Descartou o sobrenadante e secou na estufa a 50 °C. O DNA foi ressuspenso em 30 µL de água Mili-Q estéril. Para o sequenciamento, passou o DNA em seringa por 10x.

2.3. Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado através da plataforma Illumina HiSeq no modo paired-end com o tamanho do inserto de aproximadamente 450 bp. Na amostra OVI2C gerou-se 12017932 de reads e cobertura de ~776,32x. Na amostra CAP3W gerou-se 17137209 de reads e cobertura de ~1107,05x. Na amostra CAPJ4 gerou-se 16113764 de reads e cobertura de ~1040,91x. Já na amostra OVI03 gerou-se 13330646 de reads e cobertura horizontal de ~861,13x. Para calcular a cobertura, apenas foram consideradas reads mapeadas no genoma final (MARGUILES et al., 2005).

A análise da qualidade das reads foi feita no programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) e as mesmas apresentaram excelentes valores de Phred.

2.4. Montagem

Para efetuar a montagem das quatro linhagens utilizou-se o programa SPAdes versão 3.6 e o Newbler 2.9, os quais utilizam-se da estratégia *ab initio* para construção dos contigs. Na tabela abaixo está descrito os melhores resultados referentes as montagens das 4 linhagens. As mesmas foram escolhidas para as próximas etapas do processo de montagem (BANKEVICH et al., 2012).

Tabela 1. Montagem das Linhagens de *C. pseudotuberculosis* para sequenciamento no programa SPAdes versão 3.6.

Linhagem	Montador	Contigs	Total de bases	N50
OVI2C	SPAdes 3.6	13	2318524pb	722,171 pb
CAP3W	SPAdes 3.6	28	2318441pb	722,128 pb
CAPJ4	SPAdes 3.6	10	2322487pb	722,156 pb
OVI03	SPAdes 3.6	10	2318458pb	722,149 pb

Com o objetivo de ter um genoma completo, avançou-se para a etapa de scaffolding, que foi feita com programa CONTIGuator 2.7, usando como referência o

genoma *Corynebacterium pseudotuberculosis* linhagem 1002B (CP012837.1). Desta forma os contigs são ordenados por sintenia com o genoma de referência e devido ao organismo possuir um genoma circular, é feita a fixação do gene DNAa (*Chromosomal replication initiator protein dnaA*) como primeiro gene do genoma. Após a etapa de Scaffolding, continuou-se com 5 contigs e 4 gaps, os demais contigs foram excluídos por tratar-se de artefatos dispensáveis oriundos de reads não específicas a cada respectiva linhagem. O processo de fechamento dos gaps foi feito através do programa *CLC Genomics Workbench 7.0* (Qiagen, USA). Os quatro gaps eram regiões pertencentes aos *clusters* de RNAs Ribossomais, isso acontece, por tratar-se de uma região com alto valor de similaridade e repetida no genoma (GALARDINI et al., 2011).

2.5 Anotação e depósito

A anotação foi feita através de duas abordagens, uma anotação automática usando o RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) e uma transferência da anotação já curada e depositada presente no genoma de referência *Corynebacterium pseudotuberculosis* linhagem 1002B (CP012837.1) através de um script em perl desenvolvido no LGCM (Laboratório de Genética Celular e Molecular-UFMG). A predição de todos os rRNAs (*Ribosomal ribonucleic acid*) e tRNAs (transfer RNA) também foram feitas através do RAST. Finalmente é feita uma curadoria manual através do programa Artemis, com o intuito de retirar todas as anotações duplicadas e possíveis erros de predição e nomenclatura (AZIZ et al., 2008; RUTHERFORD et al., 2000).

O genoma foi depositado no NCBI - GenBank (*National Center for Biotechnology Information - Genetic Sequence Database*). O processo de submissão para a base de dados do NCBI é feito através do portal de submissão (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>), por meio do preenchimento de vários protocolos com informações sobre isolamento, característica do ambiente, hospedeiro, manipulação da amostra, armazenamento, informações biológicas intrínsecas ao organismo em questão, sequenciamento, montagem e etc.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O genoma completo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* OVI2C encontra-se com tamanho de 2337575 bp em um cromossomo circular. O conteúdo GC de 52.85% e um total de 2092 CDS (*coding DNA sequence*), 12 rRNAs (5S, 16S, and 23S), 49 tRNAs e 48 pseudogenes. O genoma completo foi depositado no GenBank com o número de acesso CP026374.

Para o *Corynebacterium pseudotuberculosis* CAP3W o genoma completo encontra-se com tamanho de 2337498 bp em um cromossomo circular. O conteúdo GC de 52.85% e um total de 2091 CDS, 12 rRNAs (5S, 16S, and 23S), 49 tRNAs e 49 pseudogenes. O genoma completo foi depositado no GenBank com o número de acesso CP026500.

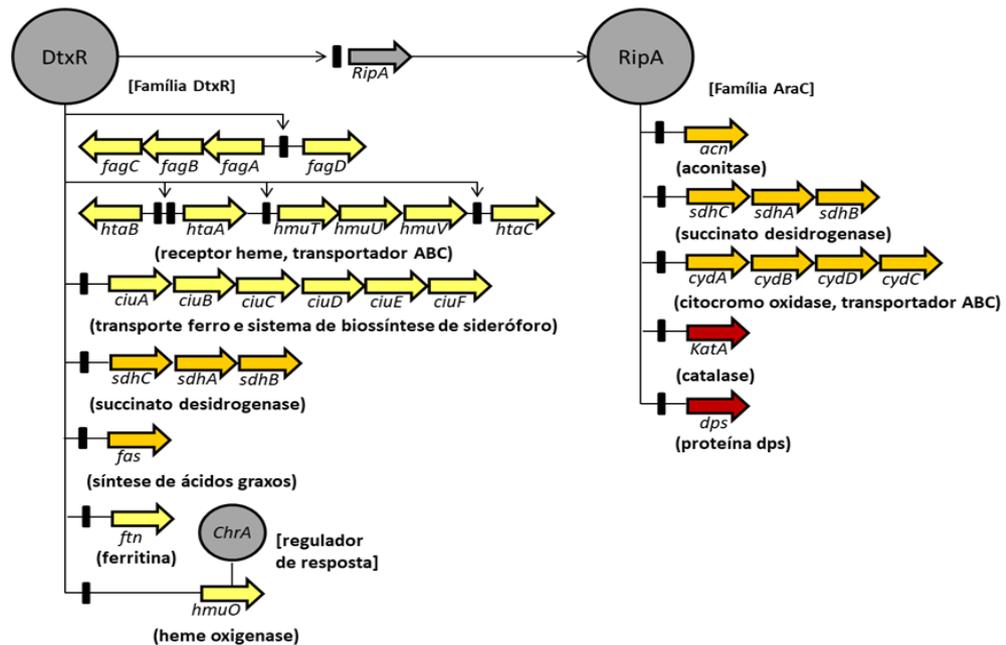
O genoma completo de *Corynebacterium pseudotuberculosis* CAPJ4 encontra-se com tamanho de 2337549 bp em um cromossomo circular. O conteúdo GC de 52.86% e um total de 2081 CDS, 12 rRNAs (5S, 16S, and 23S), 49 tRNAs e 50 pseudogenes. O genoma completo foi depositado no GenBank com o número de acesso CP026499.

Já para o *Corynebacterium pseudotuberculosis* OVI03 o genoma completo encontra-se com tamanho de 2337541 bp em um cromossomo circular. O conteúdo GC de 52.87% e um total de 2082 CDS, 12 rRNAs (5S, 16S, and 23S), 49 tRNAs e 58 pseudogenes. O genoma completo foi depositado no GenBank com o número de acesso CP026524.

Os tamanhos do genoma das quatro cepas estão dentro do esperado, pois o genoma do *C. pseudotuberculosis* cepa FRC41 possui 2337913 pb em um cromossomo circular, embora a FRC41 seja uma cepa de origem humana (TROST et al., 2010). Vários genes também são coincidentes com os genes da cepa FRC41, entre eles os genes fosfalipase D (*pld*), os sideróforos *Fag* A, B, C. e D, os transportadores de efluxo (*Ciu*). A família proteína serina-cinase (*Pkn*), as neuramidases (*Nan*). Esses genes foram encontrados em todas as cepas sequenciadas, sendo que a cepa OVI03 possui 2139 genes, a cepa OVI2C tem 2140 genes, a cepa CAP3W também possui 2140 genes e a cepa CAPJ4 foram sequenciados 2131 genes. Essa informação mostra que a maioria dos genes que

constitui os genomas do *C. pseudotuberculosis* são altamente conservados, esses genes estão ilustrados na Figura 1.

Figura 1: Genes presentes no genoma das cepas de *C. pseudotuberculosis* OVI2C, OVI03, CAPJ4, CAP3W. Os reguladores DtxR e RipA que controlam a homeostase do ferro e as interações reguladores de gene envolvido na absorção de ferro.



Fonte: Adaptado de Trost et al., (2010).

O genoma da cepa VD57, também possui características similares com as cepas deste estudo (ALMEIDA et al., 2016), observando que todas as cepas possuem os genes *rpoB* e *rpoC*, que são RNA polimerases dependentes do DNA e são responsáveis por catalisar a transcrição do DNA em RNA, usando trifosfatos de ribonucleosídeos como substratos. Já a cepa OVI2C não possui o gene *rpoZ*, diferente das demais cepas. Estudo recente mostra que o gene *rpoB* sofre mutação para o gene *rpoC* W484G e está associado com a resistência a rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis* (LI et al., 2016).

Dentre os fatores de transcrição, o gene *DtxR*, faz parte da família de reguladores de transcrição e tem um papel importante na controle da expressão dos genes envolvidos no metabolismo de ferro, onde sua função é regular a utilização de ferro e proteção do DNA. A proteína *DtxR* atua como regulador global, controlando a

expressão de outras proteínas reguladoras dependente de ferro na rede transcricional de *Corynebacterium glutamicum* (BRUNE et al., 2006).

Como o DtxR está associado com genes captadores de ferro é possível relacionar com vários outros genes que estão presentes no genoma das cepas bacterianas em estudo. Os fagA-D, são proteínas de ligação ao sideróforo de ferro e sua expressão está relacionada ao transporte de ferro e a ligação de ATP e atividades de ATPases (BILLINGTON et al., 2002). Outros genes também estão associados ao ferro, os genes hmuOTUV, permitem que as bactérias usem o heme do hospedeiro como fonte de ferro, provavelmente também são responsáveis pela translocação do substrato através da membrana, essas informações foram comprovadas por Allen & Schmitt (2009), quando caracterizaram os genes hmuTUV e o gene htaA e observaram o uso de heme como fonte de ferro em *Corynebacterium diphtheriae*, além disso também verificaram que os genes HtaA, HmuT e HtaB estão associados com a membrana citoplasmática. Os genes HtaA e HtaB podem funcionar como receptores heme na *C. diphtheriae*. Assim, foi observado que a maioria dos genes relacionados à aquisição de ferro é regulado pelo gene DtxR.

Além do DTxR, também foi observado na análise do genoma das quatro cepas em referência que todas elas possuem os genes GlxK, envolvido na atividade de fosforilação de ácidos orgânicos e o GnTR responsável pela regulação e repressão transcricional do glucanato, sendo composto por um domínio de ligação ao DNA e um domínio de sinalização, unidos entre si. As famílias dessas proteínas estão envolvidas na regulação de substratos oxidados relacionados a aminoácidos do metabolismo central (SUVORAVA et al., 2015).

Outros genes encontrados no genoma das cepas em estudo são os genes da família Mnt, com funções de transportadores de íons metálicos, participando da adesão celular gerando ATPase acoplada ao movimento transmembranar de substâncias. Nesse estudo foram encontrados os genes mntA, mntB1, mntB2, mntB3, mntC1, mntC2, mntD1, mntD3 e o mntR, cujo produto possui homologia significativa com a proteína repressora DTxR. O gene MnTR é o um gene terminal que faz o carregamento dos genes mntABCD, que são transportadores de Manganês, ferro, cobre e zinco. Esses são genes também estudados em *Corynebacterium diphtheriae* (SCHMITT, 2002).

A família neuramidase composta por NanE, NanH, NanK e NanL, também estão presentes nos quatro genomas e são responsáveis pelo processo metabólico de carboidratos, no processo catabólico de N-acetilneuraminação, onde divide o ácido sialico terminal a partir de carboidratos em glicoproteínas, resultando em fonte de energia através do carbono, esses genes também foram encontrados no genoma da cepa de *C. pseudotuberculosis* FRC41. Também foi encontrado no genoma das cepas deste trabalho os genes da família Pkn, representada pelos genes PknA, PknB, PknD, PknG e PknL, este último expressando uma proteína com atividade de cinase, com regulação na fosforilação na ligação do DNA, regulando a forma celular. As proteínas nanH e PknG já foram estudadas como fatores de virulência como potencial vacina por Santana-Jorge et al., (2016).

Outra proteína que também fez parte do estudo de Santana-Jorge et al., (2016) foi a proteína SodC, que faz parte do complexo Sod e que no presente estudo também foi encontrado nos quatro genomas, além da SodC, também foi encontrado a SodA uma proteína superóxido dismutase que tem ligação com ions metais e que destrói os radicais produzidos dentro das células. No estudo de Santana-Jorge et al. (2016) foi realizada análise *in silico* com as proteínas PknG, NanH, SodC e SpaC, sendo que todas mostraram potencial para desenvolvimento de vacinas, embora a SodC com um menor potencial. Das proteínas estudadas no trabalho *in silico*, apenas a SpaC não foi encontrada nos genomas da CAPJ4, CAP3W, OVI2C e OVI03. Esse resultado indica que essas cepas podem ser estudadas futuramente para produção de antígenos, visto que muitos genes encontrados estão relacionados com genes de virulência já conhecidos em outras cepas (TROST et al., 2010).

Dentre os mais de 2000 genes sequenciados em cada cepa deste estudo, além dos genes já mencionados outros também merecem destaque por serem bem estudados, é o caso da família dos genes Sig, neste estudo representado pelo SigA-E, sigH e SigM. Estes genes estão relacionados com o fator sigma responsáveis pelo reconhecimento do RNA polimerase pela região promotora de iniciação a locais específicos. Esse resultado está de acordo com Mariano et al. (2016), que ao sequenciar o genoma da cepa de *C. pseudotuberculosis* 1002, identificaram os genes que codificam fatores sigma que incluíram o SigA e o SigB e outros fatores extracitoplásmicos SigC, SigD, SigE, SigH, SigK e SigM, que são dispensáveis e

induzidos em resposta a condições específicas, principalmente em resposta ao estresse. Quando o gene *rpoD* de *Escherichia coli* foi induzido por choque térmico, mecanismos envolvidos na recuperação do estresse expressou os fatores sigmas sob diferentes condições para a regulação dos genes necessários a manutenção do micro-organismo (PINTO et al., 2014).

O gene *ripA*, responsável pela transcrição específica de sequência e ligação do DNA está presente nos quatro genomas estudado. Além do *ripA*, outros genes a exemplo do RPS uma proteína ribossomal 30 S que codifica vários genes estão relacionados com a produção de biofilme na bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, assim como o *sigB*. Embora esses genes tenham relação com a formação de biofilme, eles estão descritos na sequência do genoma das quatro cepas estudadas. Alguns micro-organismos utilizam a estratégia de apenas expressar seus genes de virulência quando estão em situações estressantes, nesse caso, o organismo tem a capacidade de perceber o ambiente e modular repostas rápidas e adaptativas para garantir a sobrevivência do patógeno. Os genes relacionados com a produção de biofilme estão relacionados com a regulação das proteínas ribossômicas e proteínas envolvidas na transcrição e tradução. A formação de biofilme é um processo ativo que requer das células bacterianas metabolismo dependente de condições ambientais e sinalização inter-bacteriana (TRIVEDI et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

As cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* estudadas possui genes similares, mostrando que de um modo geral importantes genes são conservados, embora algumas delas sejam mais virulentas, como as cepas produtoras de biofilme.

5. REFERÊNCIAS

ALLEN, C. E., SCHMITT, M. P. HtaA is an iron-regulated hemin binding protein involved in the utilization of heme iron in *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 8, p. 2638-2648, 2009.

ALMEIDA, S., TIWARI, S., MARIANO, D., SOUZA, F., JARNAL, S. B., COIMBRA, N., RAITTZ, R. T., DORELLA, F. A., CARVALHO, A. F., PEREIRA, F. L., SOARES, S. C., LEAL, CARLOS, A. G., BARH, D., GHOSH, P., FIGUEIREDO, H., MOURA-COSTA, L. F., PORTELA, R. W., MEYER, R., SILVA, A., AZEVEDO, A. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.

AZIZ, R. K., BARTELS, D., BEST, A.A., DeJONGH, M., DISZ, T., EDWARDS, R. A. FORMSMA, K., GERDES, S., GLASS, E. M., KUBAL, M., MEYER, F., OLSEN, G. J., OSTERMAN, A. L., OVERBEEK, R. A., McNEIL, L. K., PAARMANN, D., PACZIAN, T., PARRELO, B., PUSCH, G. D., REICH, C., STEVENS, R., VASSIEVA, O., VONSTEIN, V., WILKE, A., ZAGNITKO, O. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A. A., DVORKIN, M., KULIKOV, A. S., LESIN, V. M., NIKOLENKO, S. I., PHAM, S., PRJIBELSKI, A. D., PYSHKIN, A. V., SIROTKIN, A. V., VYAHHI, N., TESLER, G. ALEKSEYEV, M. A., PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm its applications to single cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BELOIN, C., GHICO, J. M. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 16-19, 2005.

BILLINGTON, S. J., ESMAY, P.A., SONGER, E. J., JOST, B. H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 41-45, 2002.

BRUNE, I., WERNER, H., HUSTER, A. T., KALINOWSKI, J., PUHLER, A., TAUCH, A. The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 21, 2006.

DROPPA-ALMEIDA, D., VIVAS, W. L. P., SILVA, K. K. O., REZENDE, A. F. S., SIMONATTO, S., MEYER, R., LIMA-VERDE, I. B., DELAGOSTIN, O., BORSUK, S., PADILHA, F. F. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, p.1091-1096, 2016.

GALARDINI, M., BIONDI, E. G., BAZZICALUPO, M., MENGONI, A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. **Source Code for Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011.

GUIMARÃES, A. S., CARMO, F. B., PAULETTI, R. B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G. caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and control. **The IIOAB Journal**, v.2, n.2, p.33-43, 2011.

LI, Q., JIAO, W., YIN, Q., XU, F., LI, J., SUN, L., XIAO, J., LI, Y., MOKROUSOV, I.,

- HUANG, H., SHENA, D. Compensatory mutations of rifampin resistance are associated with transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2807-2812, 2016.
- MARGUILES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W. E., ATTIYA, S. BADER, J. S. BEMBEN, L. A., BERKA, J., BRAVERMAN, M. S., CHEN, Y., CHEN, Z., DEWELL, S. B., DU, L., FIERRO, J. M., GOMES, X. V., GODWIN, B. C., HE, W., HELGESEN, S., HO, C. H., IRZYK, G. P., JANDO, S. C., ALENQUER, M. L. I., JARVIE, T. P., JIRAGE, K. B., KIM, J. B., KNIGHT, J. R., LANZA, J. R., LEAMON, J. H., LEFKOWITZ, S. M., LEI, M., LI, J., LOHMAN, K. L., LU, H., MAKHJIJANI, V. B., McDADE, K. E., McKENNA, M. P., MYERS, E. W., NICKERSON, E., NOBILE, J. R., PLANT, R., PUC, B. P., RONAN, M. T., ROTH, G. T., SARKIS, G. J., SIMONS, J. F., SIMPSON, J. W., SRINIVASAN, M., TARTARO, K. R., TOMASZ, A., VOGT, K. R., VOLKMER, G. A., WANG, S. H., WANG, Y., WEINER, M. P., YU, P., BEGLEY, R. F., ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–80, 2005.
- MARIANO, D. C. B., SOUSA, T. J., PEREIRA, F. L., ABURJAILE, F., BARH, D., ROCHA, F., PINTO, A. C., HASSAN, S. S., SARAIVA, T. D. L., DORELLA, F. A., CARVALHO, A. F., LEAL, C. A. G., FIGUEIREDO, H. C. P., SILVA, A., RAMOS, J. R. T., AZEVEDO, V. A. C. Whole-genome optical mapping reveals a mis-assembly between two rRNA operons of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 315, 2016.
- MEYER, R., REGIS, L., VALE, V., PAULE, B., CARMINATI, R., BAHIA, R. MOURA-COSTA, L., SCHAER, R., NASCIMENTO, I., FREIRE, S. *In vitro* IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.107, n. 3, p. 249-254, 2005.
- PINTO, A. C., SÁ, P. H. C. G., RAMOS, R. T. J., BARBOSA, S., BARBOSA, H. P. M., RIBEIRO, A. C., SILVA, W. M., ROCHA, F. S., SANTANA, M. P., CASTRO, T. L. P., MIYOSHI, A., SCHNEIDER, M. P., SILVA, A., AZEVEDO, V. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 14, 2014.
- REBOUÇAS, M. F., PORTELA, R. W., LIMA, D. D., LOUREIRO, D, BASTOS, B. L., MOURA-COSTA, L. F., VALE, V. L., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 213-220, 2011.
- RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J., HORSNELL, T., RICE, P., RAJANDREAM, M. A., BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.
- SÁ, M. C. A., VESCHI, J. L. A., SANTOS, G. B., AMANSO, E. S., OLIVEIRA, S. A. S., MOTA, R. A., VENERONI-GOUVEIA, G., COSTA, M. M. Activity of disinfectants

and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1319-1324, 2013.

SÁ, M. C. A., GOUVEIA, G. V., KREWER, C. C., VESCHI, J. L. A., MATTOS-GUARALDI, A. L., COSTA, M. M. Distribution of *pld* and Fag A, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 265-268, 2013a.

SANTANA-JORGE, K. T., SANTOS, T. M., TARTAGLIA, N. R., AGUIAR, E. L., SOUZA, R. F., MARIUTTI, R. B., EBERLE, R. J., ARNI, R. K., PORTELA R. W., AZEVEDO, V. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 83, 2016.

SANTOS, R. A., CARNEIRO, A., GALA-GARCIA, A., PINTO, A., BARH, D., BARBOSA, E., ABURJAILE, F., DORELLA, F., ROCHA, F., GUIMARÃES, L., ZURITA-TURK, M., RAMOS, R., ALMEIDA, S., SOARES, S., PEREIRA, U., ABREU, V. C., SILVA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. The *Corynebacterium pseudotuberculosis in silico* predicted pan-exoproteome. **BMC Genomics**. v. 13, n. 5. P. S6, 2012

SCHMITT, M. P. Analysis of a DtxR-like metalloregulatory protein, MntR, from *Corynebacterium diphtheriae* that controls expression of an ABC metal transporter by an Mn²⁺ dependent mechanism. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 24, p. 6882-6892, 2002.

SUVOROVA, I. A., KOROSTELEV, Y. D., GELFAND, M. S. GntR family of bacterial transcription factors and their DNA binding motifs: structure, positioning and co-evolution. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132618, 2015.

TRIVEDI, A., MAVI, P. S., BHATT, D., KUMAR, A. Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Communications**, v. 7, p. 11392, 2016.

TROST, E., OTT, L., SCHNEIDER, J., SCHRÖDER, J., JAENICKE, S., GOESMANN, A., HUSEMANN, P., STOYE, J., DORELLA, F. A., SOARES, S. C., D' FONSECA, V., MIYOSHI, A., RUIZ, J., SILVA, A., AZEVEDO, V., BURKOVSKI, A., GUIISO, N., JOIN-LAMBERT, O. F., KAYAL, S., TAUCH, A. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. **BMC Genomics**, v.11, n. 1, p.728-745, 2010.

(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), acesso em 04/01/2018.

(<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>), acesso em 04/01/2018.

5. CAPÍTULO II

SELEÇÃO E EXTRAÇÃO DE MOLÉCULAS DE CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PRODUTORAS E NÃO PRODUTORAS DE BIOFILME

RESUMO

A caprino-ovinocultura na região nordeste possui um grande rebanho, porém com grandes entraves na sanidade animal provocado por doenças que causam graves prejuízos, entre elas, a linfadenite caseosa, cujo patógeno, *Corinebacterium pseudotuberculosis*, uma bactéria intracelular facultativa que apresenta sua toxicidade através de genes de virulência, bem como biofilme, um aglomerado de substâncias que protege a bactéria de ambientes hostis. A busca de alternativas para combater essa doença, faz com que vários estudos com biomoléculas sejam realizados para compreender sua antigenicidade e imunogenicidade. Assim, é necessário investigar, quantificar e padronizar proteínas e outras moléculas para testes imunológicos, a partir de *C. pseudotuberculosis*. Para isso, foram selecionados para extração de biomoléculas dois isolados de *C. pseudotuberculosis* de origem caprina: CapJ4 (76) - forte produtor de biofilme e Cap3W (21), não produtor de biofilme e dois isolados de origem ovina Ovi2c (16) produtor de biofilme e OviOS03 (60) não produtor de biofilme. Essas amostras foram cultivadas em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e seus extratos foram obtidos usando solventes orgânicos (álcool butílico, álcool metílico e clorofórmio) A extração resultou em três frações de superfície. A fração F3 foi quantificada pelo método de Lowry e com ela realizou-se testes através do ensaio imunoenzimático ELISA indireto e por *western blotting*, para reconhecimento antigênico específico por anticorpos IgG de ovinos infectados com este micro-organismo. O perfil eletroforético revelou bandas com pesos moleculares de 30 a 160 kDa. Algumas bandas são coincidentes em todos os antígenos de superfície. Os antígenos de superfície apresentaram reatividade no *immunoblotting* frente aos soros de ovinos experimentalmente infectados. De todos os antígenos, os de origem caprina, apresentam melhor antigenicidade.

Palavras-chave: Antígenos, biofilme, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, imunogenicidade, proteína.

1. INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura é uma área que vem apresentando um forte crescimento no Brasil nas últimas décadas, e a região Nordeste concentra os maiores efetivos do Brasil (MAPA, 2016).

Embora essa cultura aponte um crescimento, as enfermidades que acometem os caprinos e ovinos causam prejuízos econômicos. Uma das principais doenças é a Linfadenite Caseosa (LC). A distribuição mundial desta doença, o impacto negativo no agronegócio, bem como a deficiência do tratamento e a ausência de vacinas eficazes, tornam necessários estudos mais aprofundados sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis* (SOUZA et al., 2011).

O *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria cuja prevalência está relacionada com a presença de genes de virulência, a exemplo da produção da toxina fosfolipase D (PLD), sendo o seu principal fator de virulência já estudado (PACHECO et al., 2011). Além da PLD, outros fatores de virulência precisam ser estudados, a exemplo da produção de biofilme, um aglomerado de biomoléculas que protege as bactérias contra agentes externos e fagócitos, permitindo sua sobrevivência em ambientes hostis (CHAI et al., 2008). É importante conhecer essas biomoléculas, no intuito de descobrir antígenos para serem avaliados como possíveis alvos vacinais.

A seleção de proteínas candidatas, como alvos vacinais para a LC é de extrema importância na busca de neutralizar a sua patogênese. Vacinas comerciais são baseadas em cepas atenuadas de *C. pseudotuberculosis* e não fornece a eficácia necessária, sendo preciso reforço anual, o que torna dispendiosa a profilaxia (DROPPA-ALMEIDA et al., 2016).

Assim, é importante a investigação e produção de proteínas e outras moléculas para testes imunológicos, a partir do *C. pseudotuberculosis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA.

2.2. Cepas de *C. pseudotuberculosis*

Foram selecionados quatro isolados de *C. pseudotuberculosis*, oriundos da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sendo utilizados dois isolados de caprinos (CapJ4 (76) - forte produtor de biofilme e Cap3W (21) - negativa para produção de biofilme) e dois isolados de ovinos (Ovi2c (16) moderado para formação de biofilme, e OviOS03 (60) - negativo para produção de biofilme). Em estudo anterior estes isolados foram identificados e com eles realizados testes de biofilme, bomba de efluxo, bem como presença de genes de virulência *pld*, *fagA*, B, C e D. (SÁ et al., 2013; SÁ et al., 2013a)

2.3. Cultivo

As amostras foram cultivadas em 200 mL de caldo BHI (Brain heart infusion), não suplementada e suplementada com 3% de Tween 80 por 72 horas em estufa a 37 °C. Essa metodologia teve o objetivo de aumentar a massa de bactérias e após esse crescimento efetuar a extração e quantificação de proteínas (AMANSO, 2015).

2.4. Extração de componentes somáticos hidrofóbicos com solvente orgânico

Após o cultivo bacteriano, as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 20 min a 4°C e lavadas 2 vezes com Tampão Fosfato-Salino (PBS). As massas bacterianas dos isolados 16, 21, 60 e 76 foram ajustadas para o peso de 2 g e ressuspensos em 10 mL de PBS e sonicadas a 60 Hz (cinco ciclos de 60 s). O material foi submetido à extração por três vezes com 35 mL de clorofórmio-metanol-água (5/10/4, v/v/v) por quatro horas sob agitação, seguida de centrifugação a 6.000 rpm por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes resultantes foram reunidos e o volume final foi reduzido por rota-evaporação. Esta solução final concentrada foi submetida à extração com 30 mL butanol-água (1/1, v/v) por uma hora, para extrair uma fase butanólica e uma fase aquosa, as quais foram nomeadas F1 e F2, respectivamente; a fração F2 foi submetida por este procedimento mais duas vezes, e as soluções finais foram reunidas e rota-evaporadas até chegar a 8 mL de volume. O sedimento

obtido após a extração de clorofórmio-metanol-água foi extraído três vezes com 35 mL de 9% butanol em água por 3 horas sob agitação, seguida de centrifugação a 6.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram reunidos e rota-evaporados até chegar a 8 mL de volume, resultando em antígenos de superfície (F3), (BASTOS, 2011). A concentração protéica das frações foi determinada pelo método de Lowry (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia*), utilizando soroalbumina bovina como padrão.

2.5. Caracterização da aplicabilidade dos antígenos de superfície em teste de ELISA indireto

Como modelo de ensaio imunoenzimático, foi utilizado o ELISA indireto descrito por Guimarães et al., (2009), aplicado na detecção de anticorpos IgG específicos anti-*C. pseudotuberculosis* em ovinos. As placas foram sensibilizadas com as soluções dos antígenos de superfície (F3) de duas cepas, uma produtora de biofilme (76) e outra não produtora de biofilme (21), ajustadas nas concentrações 0,5 µg/mL, diluída em 1:100, em tampão carbonato bicarbonato, sendo incubadas a 4°C por 16 horas. A etapa do bloqueio foi conduzida com PBS/leite em pó desnatado 5% e com PBS 0,05% Tween-20 (PBS-T) por duas horas. Utilizou-se um *pool* de amostra como controle positivo (CP) e um *pool* de amostra controle negativo (CN) e demais soros pesquisados diluídos em PBS-T contendo 1% de caseína hidrolisada na proporção de 1:100 e incubados por 1 hora. Esse *pool* de amostras foi realizado utilizando para o controle negativo soros de ovinos (5) com densidade óptica (DO) de até 0,150 e o *pool* de amostra para o controle positivo foi utilizado com soros ovinos (5) com DO acima de 0,650. Após lavagens em PBS-T, foram utilizados imunoglobulina anti-IgG de ovino conjugada a peroxidase (*Bethy*) na concentração de 1:20000, e após incubação a 37°C por 45 minutos, a revelação com o cromógeno Tetrametilbencidina (TMB), sendo a reação interrompida pela adição de H₂SO₄. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, utilizando-se filtro de 450-630 nm de comprimento de luz. Os testes foram conduzidos em duplicata.

2.6. Análise do perfil eletroforético

A análise do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) e do padrão de reconhecimento de antígenos pelas imunoglobulinas foi conduzida através do *software GelAnalyzer v.2010*, sendo estabelecidos os pesos moleculares estimados de cada antígeno.

2.7 Caracterização do perfil eletroforético e do reconhecimento antigênico por IgG

As frações obtidas foram submetidas ao procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Posteriormente, os géis foram corados utilizando-se nitrato de prata, sendo outro gel eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose e realizado o *Western blotting*. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS-T acrescido de 5% de soroalbumina bovina por 12 horas a 4 °C; em seguida, foi incubada a 37 °C por 1 h com um *pool* de amostras de soro de ovinos com infecção confirmada por *C. pseudotuberculosis* e outro *pool* de soro ovino negativo para o *C. pseudotuberculosis*, diluído 1:50 em PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado. Foram utilizados os anticorpos de detecção anti-IgG de ovinos conjugados com peroxidase (*Bethyl*) diluídos em PBS-T na proporção de 1:250, sendo também incubados por uma hora. A revelação foi conduzida com cromógeno 4-cloro- α -naftol adicionado de substrato peróxido de hidrogênio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados semeados em caldo BHI não suplementado e suplementado com Tween 80 a 3% foram centrifugados, sonificados e a extração de suas moléculas de membrana foram extraídas por clorofórmio/metanol/água e o *pellet* resultante foram extraídos com butanol a 9%. Foi realizada a quantificação de proteína pelo método Lowry resultante dessa extração. A concentração proteica total foi determinada e os resultados apresentados na Tabela 1.

Após a extração dos isolados com butanol a 9%, estes foram quantificados pelo método de Lowry. A maior concentração de proteínas foi observada nos isolados que foram suplementados com 3% de Tween 80 em relação à concentração de proteínas dos isolados cultivados apenas com o BHI. O Tween 80 contribuiu para

o aumento da massa bacteriana, este fato pode estar associado ao aumento da concentração de proteínas. Entretanto, em relação ao isolado forte produtor de biofilme (76), não houve aumento na concentração das mesmas. Em relação, ao isolado 21, que é de origem caprina e negativo para produção de biofilme, houve um aumento de 0,158 mg/mL para 0,908 mg/mL.

Tabela 1. Quantificação proteica da fração do antígeno de superfície (F3) extraída com butanol a 9%.

Amostras	Suplementada com 3% de Tween 80 (mg/mL)	Sem suplementação (mg/mL)
16	0,444	0,239
21	0,908	0,158
60	0,596	0,542
76	0,850	0,872

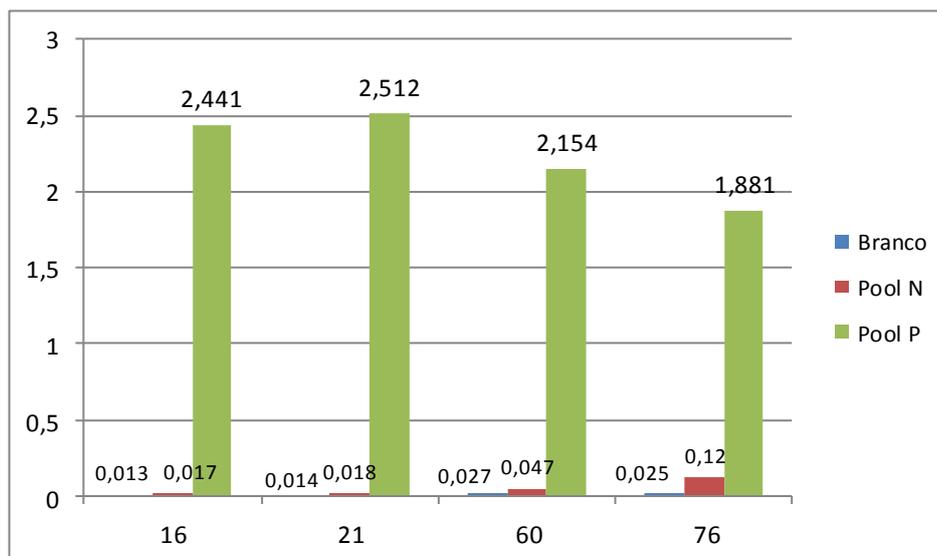
Nielsen et al., (2016), investigaram o crescimento e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* em meio de cultura com adição de Tween 80 e observaram um aumento na taxa de crescimento em bactérias planctônicas, bem como um aumento na biomassa de *S. aureus* produtor de biofilme, porém retardou o crescimento de *P. fluorescens* e diminuiu a produção do biofilme destes. Tribedi et al., (2013), observaram que o Tween 80 diminuiu a adesão bacteriana e inibiu a produção de biofilme em *Pseudomonas sp.*, como o Tween 80 foi adicionado antes da fase de ligação do desenvolvimento do biofilme, mostra que ele tem efeito sobre a ligação bacteriana a superfícies abióticas. Ishida et al. (2011), utilizaram o Tween 80 em meio de cultura e este inibiu a formação de biofilme em *Mycobacterium smegmatics*, esta ação pode está relacionada com a imobilização das enzimas nos substratos, reduzindo a força de adesão do biofilme.

Os resultados deste estudo para *C. pseudotuberculosis* evidenciaram aumento da biomassa bacteriana dos isolados planctônicos e possivelmente inibiram a produção de biofilme. Dessa forma, foi observado que existem variáveis que implicam no crescimento de *C. pseudotuberculosis*, aumentando a dificuldade de

padronização de cultivos para obtenção de antígenos úteis para testes sorológicos e imunização. Essa variável acontece porque cada forma de cultivo e de extração dos componentes bacterianos é diferente, ademais ainda não existe um meio de cultura padrão para o cultivo de *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme para extração de antígenos.

Em relação ao reconhecimento antigênico das frações dos antígenos de membrana das cepas em referência, neste estudo foi realizado um teste de ELISA indireto para verificar o reconhecimento antigênico por imunoglobulina G (IgG). Esse resultado está apresentado na Figura 1.

Figura 1. Medida da densidade óptica (média) no ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) com fração dos antígenos de superfície (F3) de cepas produtoras e não produtoras de biofilme.



Legenda: 16 = OVI2C; 21= CAP3w; 60 = OVIS03; 76= CAPJ4

A fração F3 da amostra caprina (21), negativa para biofilme mostrou maiores valores de densidade óptica (DO), seguida por esta fração obtida a partir da amostra ovina (16) produtora de biofilme. Esse resultado mostra que a produção do biofilme aparentemente não tem interferência na intensidade de reação do teste ELISA utilizado. Ao contrário do que ocorreu *western blotting*, onde a fração F3 da amostra caprina (76) produtora de biofilme mostrou mais reatividade que as mesmas frações

das demais amostras, no ELISA indireto usando o mesmo *pool*, o uso de antígenos da amostra 76 mostrou menor intensidade de reação.

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 12% das proteínas de membrana de *C. pseudotuberculosis* das frações de antígenos (F3) das amostras 16, 21, 60 e 76, encontra-se na Figura 2. Esse perfil mostra que o antígeno 16 apresentou moléculas de peso estimado em 38 kDa, 74 kDa, e 138 kDa, na amostra 21, bandas nos tamanhos de 30 kDa, 42 kDa, 74 kDa, 103 kDa e 138 kDa, para a amostra 60, as bandas 30 kDa, 52 kDa, 55 kDa, 103 kDa e 160 kDa e, finalmente, a amostra 76 apresenta moléculas com peso de 30 kDa, 52 kDa, 103 kDa e 163 kDa. Algumas bandas são coincidentes em todos os antígenos de superfície das diferentes cepas avaliadas. Observa-se que a banda com peso molecular de aproximadamente 30 kDa está presente em todas as amostras e provavelmente trata-se da proteína PLD, visto que o gene que codifica essa proteína foi encontrado nessas cepas em estudo genotípico anterior (SÁ et al., 2013).

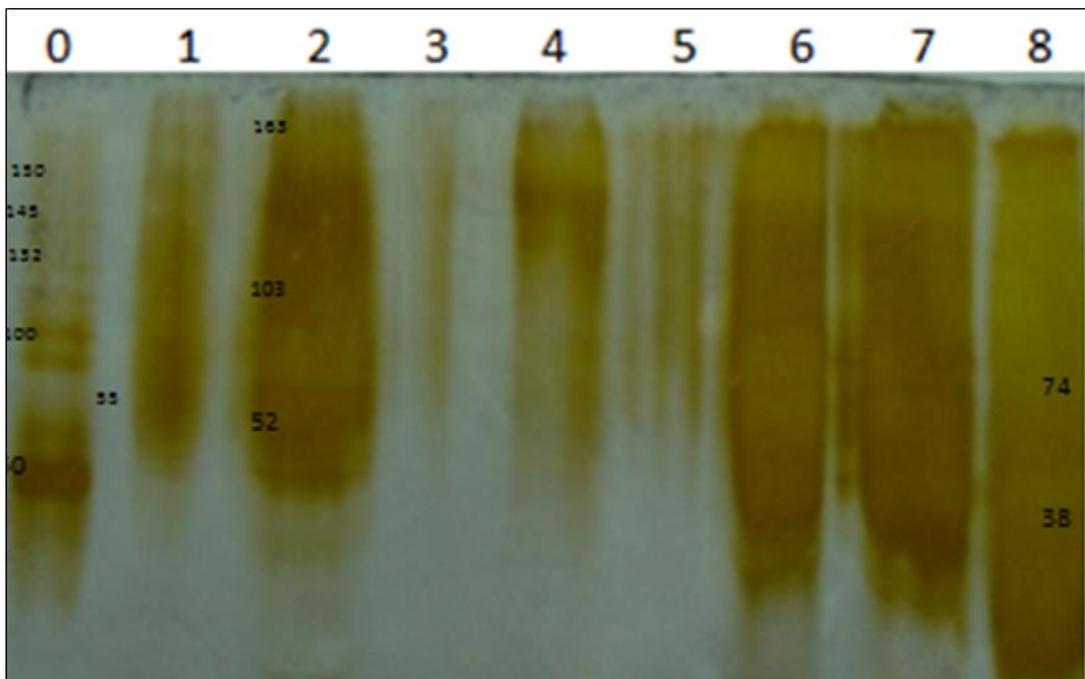
Para confirmar o reconhecimento antigênico das frações de superfície destes extratos, foi realizado o *western blotting*, frente a um *pool* de soros de ovinos já testados e com resultado negativo e um *pool* positivo para o *C. pseudotuberculosis*. O resultado pode ser observado na Figura 2, revelando algumas bandas de diferentes pesos moleculares. A fração de superfície da amostra 76, que é de origem caprina e é produtora forte de biofilme tem mostrado bandas com maiores reatividades em relação às demais amostras, bem como o maior número de bandas reveladas no SDS-PAGE.

Na Figura 2, a avaliação antigênica através da membrana de *western blotting*, mostra que houve reatividade frente ao *pool* de soros de ovinos infectados com *C. pseudotuberculosis*, visto que apareceram bandas. Já para a banda com o *pool* de soros negativos, não houve revelação.

No teste realizado para verificar o reconhecimento antigênico por IgG das frações dos antígenos de superfície, o ELISA indireto mostrou que a concentração de proteínas dos antígenos, embora baixa, apresentou reatividade com o *pool* de soros positivos. Outro fato que explica a predominância de títulos elevados de IgG, é a presença da exotoxina PLD, que possui propriedades imunogênicas e foi encontrada em todos os isolados avaliados (SÁ et al., 2013a). O teste de ELISA também evidenciou variação nos resultados entre os isolados, porém essa diferença

pode ser explicada pela diversidade metabólica observada entre os mesmos, o que mostra que cada cepa é específica, sobretudo por diversos glicoconjugados em cada uma delas, principalmente nos isolados produtores de biofilme (BALES et al., 2013).

Figura 2. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata dos antígenos de superfície (F3) das cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme. (T= cultivo com tween 80 no meio).



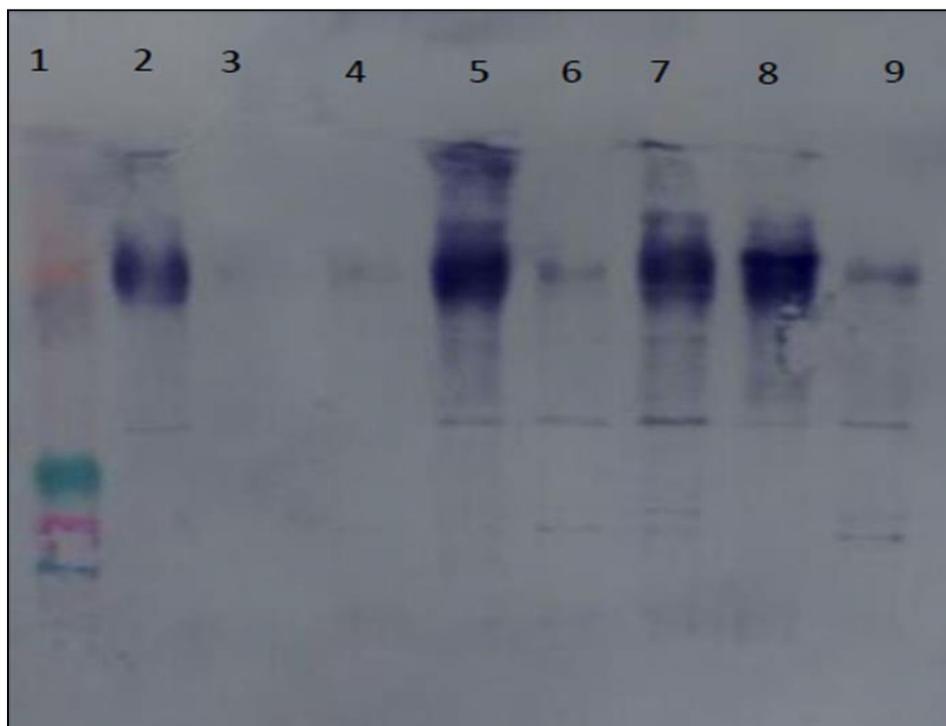
Legenda: 0 - Marcador molecular; 1 - 60T; 2 - 60; 3 - 76T; 4 - 76; 5 - 21T; 6 - 21; 7 - 16T; 8 - 16.

A diversidade de expressões gênicas do *C. pseudotuberculosis* é estudada por diversas ferramentas, entre elas o RNA-seq, RTqPCR, ERIC-PCR. Esses estudos mostram que existe uma variação de genes em cada isolado, bem como, diferentes mecanismos de regulação gênica, que podem variar de acordo com o ambiente onde a bactéria vai expressar esses genes (CARVALHO et al., 2014; GUIMARAES et al., 2011a). Silva et al., 2013, observaram diferenças entre o exoproteoma das cepas Cp 1002 e Cp C231. Essa análise mostra que essa variação pode influenciar na patogenicidade e antigenicidade.

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida confirmou a presença de várias bandas nos antígenos de superfície das quatro cepas avaliadas, o que também foi

determinado pela análise de *western blotting*, utilizando soro de ovinos experimentalmente infectados com *C. pseudotuberculosis*. Assim, pode-se observar que todos os isolados possuem antigenicidade, porém a fração de membrana do isolado 21 evidenciou maior diversidade de bandas no perfil eletroforético, ao passo que no extrato do antígeno 76 foram detectadas bandas mais intensas refletindo numa provável maior expressão (SILVA et al., 2013).

Figura 8. *Western Blotting* com perfil de reatividade para antígeno de superfície, para as amostras 16, 21, 60 e 76 cultivadas com BHI e BHI Tween-80 (T) frente a um *pool* de soro de ovinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis*.



Legenda: 1- marcador molecular; 2 - antígeno 16; 3 - antígeno 21; 4 - antígeno 60; 5 - antígeno 76; 6 - antígeno 16T; 7 - antígeno 21 T; 8 - antígeno 60T e 9- antígeno 76 T.

Todas as amostras apresentaram bandas com peso molecular de aproximadamente 30 kDa no gel de poliacrilamida, indicando a provável presença da proteína PLD. Vários outros padrões de bandas foram semelhantes aos resultados encontrados por Paule et al., (2004), quando realizaram estudo com proteínas secretadas de *C. pseudotuberculosis*, frente a soro caprino positivo para este micro-organismo. Moura-Costa et al., (2008), também observaram pesos moleculares

semelhantes, quando extraíram antígenos a partir da cepa T1 atenuada para monitorar a resposta humoral em caprinos Canindé. Esses achados da literatura mostram que cada cepa pode apresentar diferentes perfis eletroforéticos no *immunoblotting*, o que indica a ocorrência de algumas moléculas estruturais específicas e outras coincidentes, além de diferenças nas técnicas empregadas de extração ou de avaliação da imunorreatividade.

O estudo da imunorreatividade é importante, pois o desempenho e a aplicabilidade de testes sorológicos dependem da seleção do antígeno, sendo os melhores antígenos aqueles imunodominantes, ou seja, que sejam reconhecidos pela maioria da população de animais verdadeiramente infectados. Holzle et al. (2013) observaram os antígenos de *C. pseudotuberculosis* com pesos moleculares de 150 kDa, 74 kDa, 48 kDa e 30 kDa foram imunodominante. Nesse trabalho pesos moleculares semelhantes também foram observados em todas as frações, o que sinaliza que a reatividade encontrada no *western Blotting* pode indicar moléculas imunodominantes, e que esses antígenos podem ser utilizados para detectar a resposta imunológica desencadeada pela infecção por *C. pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos. Esse resultado preliminar evidencia a existência de alvos promissores para purificação e desenvolvimento de imunoenaios.

4. CONCLUSÃO

Foram extraídos dos isolados produtores e não produtores de biofilme de *C. pseudotuberculosis*, antígenos de superfície que apresentaram reatividade ao ser avaliado pelo teste ELISA e pelo *immunoblotting*, frente aos soros de ovinos experimentalmente infectados. Dos antígenos testados, os de cepas de origem caprina, indicaram maiores reatividades, embora sem diferenças estatísticas. Estes resultados apontam a possibilidade de novos experimentos que possam indicar a utilização destas moléculas como vacinas.

5. REFERÊNCIAS

- AMANSO, E. S. **Enzima superóxido dismutase em isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes.** Dissertação (Dissertação em ciências veterinária), UNIVASF- Petrolina, p. 60, 2015.
- BALES, P. M., RENKE, E. M., MAY, S. L., SHEN, Y., NELSON, D. C. Purification organisms and other pathogens. **PLOS One**, v. 8, n.6, p. e67950, 2013.
- BASTOS, B. L. **Resposta imune de ovinos a antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* associados a saponinas de *Quillaja saponaria* como adjuvantes e prospecção de antígenos somáticos com potencial aplicabilidade em sistemas de imunodiagnóstico.** Tese (Doutorado em imunologia), UFBA – Salvador, p. 92, 2011.
- CARVALHO, D. M., SÁ, P. H., CASTRO, T. L. P., CARVALHO, R. D., PINTO, A., GIL, D. J. P., BAGANO, P., BASTOS, B., MOURA-COSTA, L. F., MEYER, R. SILVA, A., AZEVEDO, V., RAMOS, R. T. J., PACHECO, L. G. C. Reference genes for RT-qPCR studies in *Corynebacterium pseudotuberculosis* identified through analysis of RNA-seq data. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 4, p. 605-614, 2014.
- CHAI, Y., CHU, F., KOLTER, R., LOSICK, R. Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, V. 67, n. 2, p. 254-263, 2008.
- DROPPA-ALMEIDA, D., VIVAS, W. L. P., SILVA, K. K. O., REZENDE, A. F. S., SIMONATTO, S., MEYER, R., LIMA-VERDE, I. B., DELAGOSTIN, O., BORSUK, S., PADILHA, F. F. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, p.1091-1096, 2016.
- GUIMARÃES, A. S., CARMO, F. B., PAULETTI, R. B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G. caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and control. **The IIOAB Journal**, v.2, n.2, p.33-43, 2011.
- GUIMARÃES, A. S., DORNELES, E. M., ANDRADE, G. I., LAGE, A. P., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G., HEINEMANN, M. B. Molecular isolates using ERIC-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 153, p. 299-306, 2011a.
- GUIMARÃES, A. S., SEYFFERT, N., BASTOS, B. L., PORTELA, R. W. D., MEYER, R., CARMO, F. B., CRUZ, J. C. M., MCCULLOCH, J. A., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1-3, p. 86-91, 2009.
- HOELZLE, L. E., SCHERRER, T., MUNTWYLER, J., WITTENBRINK, M. M., PHILIPP, W., HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 359-365, 2013.

ISHIDA, S., ARAI, M., NIIKAWA, H., KOBAYASHI, M. Inhibitory effect of cyclic trihydroxamate siderophore, desferrioxamine E, on the biofilm formation of *Mycobacterium* species. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 6. p. 917-920, 2011.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA – Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprilos-e-ovinos/saiba-mais>, acesso em 02.01.2018.

MOURA-COSTA, L. F., BAHIA, R. C., CARMINATI, R., VALE, V. L. C., PAULE, B. J. A., PORTELA, R. W., FREIRE, S. M., NASCIMENTO, I., SCHAEER, R., BARRETO, L. M. S., MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 131-141, 2008.

NIELSEN, C.K., KJEMS, J., MYGIND, T., SNABE, T., MEYER, R.L. Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in Laboratory media. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.1-10, 2016.

PACHECO, L. G. C., SLADE, S. E., SEYFFERT, N., SANTOS, A. R., CASTRO, T. L. P., SILVA, W. M., SANTOS, A. V., SANTOS, S. G., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A. R., PIMENTA, A. M. C., MEYER, R., SILVA, A., SCRIVENS, J. H., OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, A., DOWSON, C., AZEVEDO, V. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiology**, v.11, p.1-14, 2011.

PAULE, B. J. A., AZEVEDO, V., MOURA-COSTA, L. F., FREIRE, S. M., REGIS, L. F., VALE, V. L. C., BAHIA, R. C., CARMINATI, R., NASCIMENTO, I., MEYER, R. SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v 3, n.1, p. 44-52, 2004.

SÁ, M. C. A., VESCHI, J. L. A., SANTOS, G. B., AMANSO, E. S., OLIVEIRA, S. A. S., MOTA, R. A., VENERONI-GOUBEIA, G., COSTA, M. M. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1319-1324, 2013.

SÁ, M. C. A., GOUBEIA, G. V., KREWER, C. C., VESCHI, J. L. A., MATTOS-GUARALDI, A. L., COSTA, M. M. Distribution of *pld* and Fag A, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseous lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 265-268, 2013a.

SILVA, W. M., SEYFFERT, N., SANTOS, A. V., CASTRO, T. L. P., PACHECO, L. G. C., SANTOS, A. R., CIPRANDI, A., DORELLA, F. A., ANDRADE, H. M., BARH, D., PIMENTA, A. M. C., SILVA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. **Microbiol Pathogenesis**, v. 61-62, p. 37-42, 2013.

SOUZA, M. F., CARVALHO, A. A., GARINO Jr., F. RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011.

TRIBEDI, P., SIL, A. K., Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp AKS2 biofilm. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 20, n.6, p. 4146-4153, 2013.

6. CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO CLÍNICA E HEMATOLÓGICA EM CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis* PRODUTORA E NÃO PRODUTORA DE BIOFILME

RESUMO

O aumento na produção e o consumo de produtos caprinos estão em expansão, entretanto, ainda é necessário melhorar alguns fatores na produção, principalmente na área sanitária. Vários patógenos são responsáveis por doenças persistentes, o *C. pseudotuberculosis*, causa a linfadenite caseosa, bactéria que possui vários mecanismos de virulência, entre eles, o biofilme que protege a bactéria no sistema de escape imunológico, aumentando a persistência da infecção. Assim, os animais foram avaliados clinicamente, bem como fora, realizados hemogramas em caprinos infectados e não infectados por *C. pseudotuberculosis* comparando cepas produtoras e não produtoras de biofilme. Foram utilizados dezoito caprinos da raça Canindé, com idade aproximada de seis meses, onde estes foram divididos em três grupos, sendo um grupo controle, sem infecção, um grupo infectado com uma cepa de *C. pseudotuberculosis* produtora de biofilme e outro grupo infectado com uma cepa não produtora de biofilme. Antes da infecção foi coletado 4 mL de sangue para realização do hemograma. Após a infecção dos animais foram realizadas coletas de sangue e exame clínico nos tempos 7, 14, 28, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias pós-infecção. Após esse período os animais foram abatidos tecnicamente para análise *post mortem*. Foi possível observar a presença de lesões em todos os animais infectados, concluindo-se que a cepa produtora de biofilme causou maiores danos nos animais. Para as condições de infecção experimental, os valores do hemograma estão dentro da normalidade, ocorrendo um aumento nos leucócitos na infecção aguda, bem como na fase crônica da doença e isto pode sugerir uma reinfeção da doença, principalmente na cepa de *C. pseudotuberculosis* produtora de biofilme, indicando que esta provavelmente é mais virulenta.

Palavras-chave: Caprino, biofilme, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, hemograma, infecção experimental.

1. INTRODUÇÃO

A produção de caprinos é muito importante em vários países e notadamente no Brasil, onde possui um maior efetivo desse rebanho. Embora, a produção desses animais esteja em expansão, várias doenças ainda os acometem. Dentre elas, a Linfadenite Caseosa, que sem dúvida reduz a produtividade destes animais (ANDRADE et al., 2012; BAIRD; FONTAINE, 2007; SOUZA et al., 2011).

A linfadenite caseosa, enfermidade cosmopolita, apresenta alta prevalência em diversas regiões brasileiras, particularmente no Semiárido nordestino, causando prejuízos aos produtores. É caracterizada por sua cronicidade, levando o animal a perda de peso, depreciação da pele e redução na produção de carne e leite, algumas vezes provocando o descarte do animal por condenação de carcaças, além da morte ocasional com disseminação sistêmica do organismo (ANDRADE et al., 2012; FONTAINE; BAIRD, 2008).

Para manter o rebanho saudável é necessário um acompanhamento rigoroso dos animais, através de exames clínicos e, dentre outros, de exames hematológicos. Assim, Segundo Ndoutamia & Ganda (2005), a hematologia clínica é uma importante área de estudo sobre o estado sanitário dos animais. Porém, o hemograma necessita de uma adequada interpretação, bem como é necessário analisar a influência de vários fatores como condições climáticas e ambientais, além das variáveis intrínsecas ao animal como sexo, raça, idade, gestação, lactação entre outras características.

Quando o animal está infectado por patógenos intracelulares, como o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente da Linfadenite Caseosa, os granulomas decorrentes do processo infeccioso possuem estrutura celular complexa e revela grande contingente de células epitelióides, macrófagos, neutrófilos e linfócitos em menor quantidade (MOURA-COSTA, 2002). *C. pseudotuberculosis* possui vários fatores de virulência, entre eles, o biofilme que confere proteção à bactéria em ambientes hostis, favorecendo a sua sobrevivência, através de mecanismos de escape imunológico (CLARY et al., 2018; FORESTIER et al., 2017). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar através de exames clínicos e hemogramas, caprinos infectados e não infectados por *C. pseudotuberculosis*, comparando cepas produtoras e não produtoras de biofilme.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Comissão de Ética no Uso de Animais

Esse experimento foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA - ICS) sob o número 123/2017.

2.2. Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA e na Estação experimental de pequenos ruminantes - UFBA de Salinas de Margarida-BA, localizada a latitude 12°52'16" e longitude 38°45'52", clima tropical úmido e temperatura média de 3° °C.

2.3. Cepas de *C. pseudotuberculosis*

Foram selecionados dois isolados de *C. pseudotuberculosis* provenientes de caprinos, sendo uma estirpe (CapJ4 (76) - forte produtora de biofilme e outra estirpe Cap3W (21) - negativa para produção de biofilme). Esses isolados são originários da cidade de Petrolina-PE.

2.4. Cultivo bacteriano de isolados e contagem de células para inoculação em caprinos

As amostras foram cultivadas em 200 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), por 48 horas em estufa a 37 °C. Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 6 000 rpm, desprezando o sobrenadante e acrescentando 10 mL de solução salina estéril para ressuspender todo o *pellet*. Em seguida foi retirado 1 mL da cultura bacteriana, lavado duas vezes com solução salina, centrifugando por 5 minutos a 5.000 rpm. Depois de desprezar o sobrenadante foi adicionado *Sybr Safe* (Invitrogen), corante para marcar as células bacterianas, diluído 1:20 e incubado por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Depois foi realizada nova lavagem para remoção do reagente e ressuspendido com 1 mL de solução salina. Em

seguida foram retirados 50 μ L da suspensão bacteriana e acrescido de 450 μ L de solução salina, em tubos com *Beads trucount* (BD Biosciences) para realizar a contagem do inóculo por mensuração em citometria de fluxo. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo: bactérias totais = nº eventos bactérias / nº eventos *beads* x nº de *beads* por μ L (constante no lote) (SAMPAIO, 2012).

2.5 Caprinos

Foram utilizados no experimento 18 caprinos da raça canindé com idade média de seis meses, provenientes de Geremuabo, área considerada não-endêmica para Linfadenite Caseosa. Os animais foram submetidos à anamnese e exame clínico, procedendo-se a obtenção de sangue para realização de sorologia para *C. pseudotuberculosis*, antes de chegarem à Unidade Experimental em Salinas da Margarida – BA. Em relação aos animais para o experimento *in vivo*, assim que chegaram à estação experimental os animais foram identificados individualmente com brincos. Todos os animais foram tratados com anti-helmíntico antes do início do experimento. Durante o período experimental, os caprinos foram alimentados com feno de gramíneas, além de suplementação mineral e proteica e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em três grupos. O grupo 1 (controle) (n=6) fêmeas, inoculadas apenas com solução salina 0,9%. O grupo 2 (n=6) machos inoculados com a cepa Cap3W (21). O grupo 3 (n=6) machos inoculados com a cepa CapJ4(76). A Tabela 1 apresenta a distribuição destes animais nos três grupos. A inoculação dos animais foi realizada com 1 mL de solução salina contendo 2×10^6 UFC de *C. pseudotuberculosis*. Todas as inoculações foram realizadas por via subcutânea, na região pré-escapular direita do animal. A cada coleta de sangue os animais foram examinados clinicamente e as fezes coletadas para exame parasitológico, no intuito de acompanhar a sanidade dos animais. Cada animal tinha uma ficha individual para anotações de ocorrências.

Tabela 1. Distribuição de animais nos três grupos experimentais: Grupo 1 - Controle; Grupo 2 - Infectado experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme (21) e Grupo 3 - Infectado experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme (76)

Grupo 1 (Controle)	Grupo 2 (21)	Grupo 3 (76)
Animal nº 51	Animal nº 60	Animal nº 57
Animal nº 52	Animal nº 63	Animal nº 58
Animal nº 53	Animal nº 69	Animal nº 59
Animal nº 54	Animal nº 72	Animal nº 61
Animal nº 55	Animal nº 75	Animal nº 65
Animal nº 56	Animal nº 79	Animal nº 67

2.6. Hemograma

O hemograma foi realizado nos tempos zero (antes da inoculação), 7,14, 28, 45, 60, 90, 120, 150e 180 dias pós-inoculação, de forma automatizada, utilizando 2 mL de sangue. Neste exame foram avaliados: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM (volume globular médio), HGM (hemoglobina globular média) CHGM (concentração de hemoglobina globular média), RDW (amplitude de distribuição de glóbulos vermelhos), neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

2.7. Estatística

Para análise do hemograma foi utilizado o teste de normalidade pra o teste paramétrico ANOVA, com o pós-teste Tukey em nível de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação às anotações de ocorrências nos animais, No dia 35^o do experimento foi observado que dois animais do grupo 3 (76) vieram a óbito por evento externo à pesquisa e não relacionado a nenhum problema clinico ou sanitário. As anotações para o acompanhamento dos animais durante o período do experimento e *post mortem*, estão descritos na Tabela 2 e 3.

Todos os animais infectados com *C. pseudotuberculosis* apresentaram abscesso no local da inoculação. Essas informações foram importantes para correlacionar com os demais resultados, principalmente com aqueles dos hemogramas, onde os valores podem ser observados nas Figuras de 1 a 7. Algumas variáveis chamam atenção por representar um comportamento diferente dentro dos parâmetros do hemograma, entretanto, o acompanhamento clínico dos animais pode explicar esses resultados.

É importante observar que os parâmetros hematológicos podem variar muito de acordo com o estado de saúde do animal, bem como com outras variáveis como condições climáticas e ambientais. Assim, como o estado nutricional, gestação, lactação, manejo, raça, sexo e idade podem influenciar no resultado do hemograma (NDOUTAMIA; GANDA, 2005).

Em relação ao resultado dos hematócritos descrito na Figura 1 observa-se uma diferença estatística pós-inoculação (PI) no grupo controle, portanto não infectado, em relação ao grupo infectado com a cepa 21. Existe um aumento dos hematócritos PI 45, 90, 120 e 150 dias. Estes picos foram relacionados às fêmeas que não estavam em estado gestacional ou lactante, concordando com o resultado de Oliveira et al. (2012), que analisaram caprinos da mesma raça (canindé), e observaram que fêmeas não gestantes possuem uma média de $32,15 \pm 5,16$, concordando com os valores desse trabalho. Outro fato que indica menores valores de hematócrito nos animais é a própria infecção, como já comentado em relação ao grupo infectado com a cepa 21.

Já na Figura 2 está descrito o perfil de leucócitos totais, existindo um aumento dos leucócitos nos grupos (2)21 e (3)76, nos tempos 7,14 e 28, onde a infecção está aguda. O aumento de leucócitos totais mostra o que naturalmente acontecem com caprinos infectados por infecções bacterianas, pois aumentam a contagem de neutrófilos e monócitos devido à imunossupressão transitória bem como outras células do sistema leucocitário, onde a infecção por *C. pseudotuberculosis*, resulta num aumento significativo na maioria desses parâmetros (IBTISAM, 2008).

Tabela 2. Registros de ocorrências relevantes durante o experimento em caprinos da raça Canindé, infectados e não infectados com *C. pseudotuberculosis* produtor e não produtor de biofilme.

Animal-grupo	Ocorrências
51-C	Com 78 dias do experimento, parto de um filhote;
53 e 54-C	Presença de parasitas no tempo zero do experimento;
55-C	Com 83 dias do experimento, parto de um filhote, produção de leite alta;
75-2	Presença de parasita no tempo zero e 7 do experimento e granuloma no pré-escapular direito;
79-2	Presença de granuloma no pré-escapular direito;
57-3	Abscesso nos linfonodos pré-parotídeo D, pré-cural D/E, (2) região subescapular (D) e (2) região pré-escapular D;
58-3	Animal veio a óbito;
59-3	Abscesso na região pré-escapular;
65-3	Abscesso nos linfonodos pré-escapular D, subescapular D (4);
67-3	Animal veio a óbito.

Na análise da Figura 3, também se observa um resultado normal para o quadro de neutrófilos, embora tenha apontado diferença estatística para os tempos 7, 14 e 28, o grupo (2) 21 apresentando uma neutrofilia em relação ao grupo controle, o fato já é bem descrito na literatura, na qual animais infectados com microorganismos bacterianos têm um aumento substancial de neutrófilos na infecção aguda, por essas serem as primeiras células sanguíneas recrutadas pelo sistema imunológico inato para defesa do hospedeiro (MAHMOOD et al., 2015; ODHAH et al., 2017).

Tabela 3. Registros de ocorrências relevantes no *post mortem* de caprinos da raça Canindé, infectados e não infectados com *C. pseudotuberculosis* produtor e não produtor de biofilme.

Animal-grupo	Ocorrências
56-C	No <i>post mortem</i> - verificou-se que o animal tinha nefrose;
60-2	Linfonodo pré-escapular D com granuloma no <i>post mortem</i> ;
69-2	No <i>post mortem</i> foi observado abscesso mediastínico, granuloma linfonodo direito;
72-2	No <i>post mortem</i> o animal foi condenado pela inspeção por ser observado broncopneumonia com várias lesões no pulmão;
75-2	No <i>post mortem</i> foi observado nefrite;
57-3	No <i>post mortem</i> animal foi condenado pela inspeção por está com pneumonia, pulmão com granulomas;
65-3	No <i>post mortem</i> animal foi condenado pela inspeção por está com linfonodo cervical com vários granulomas e outros granulomas viscerais.

Figura 1. Perfil do hematócrito observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) – infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.

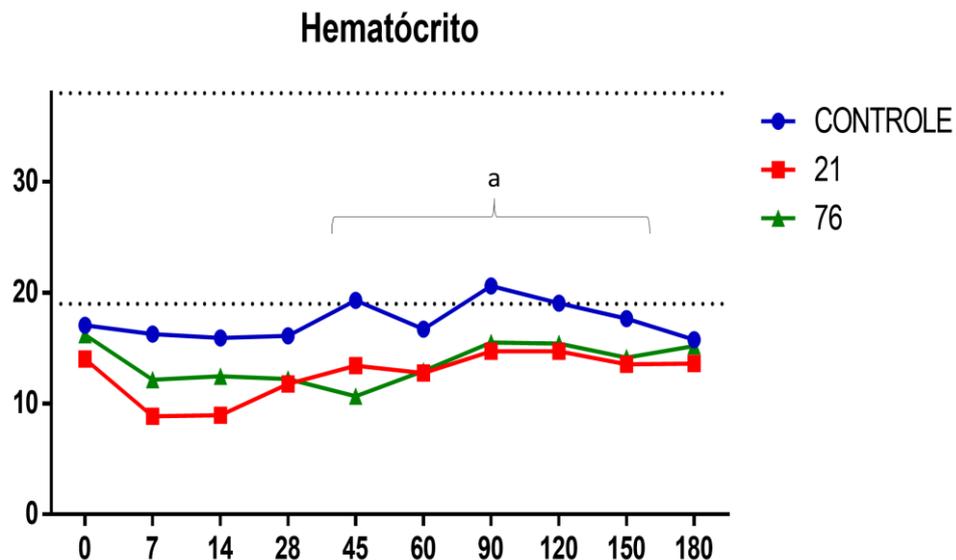
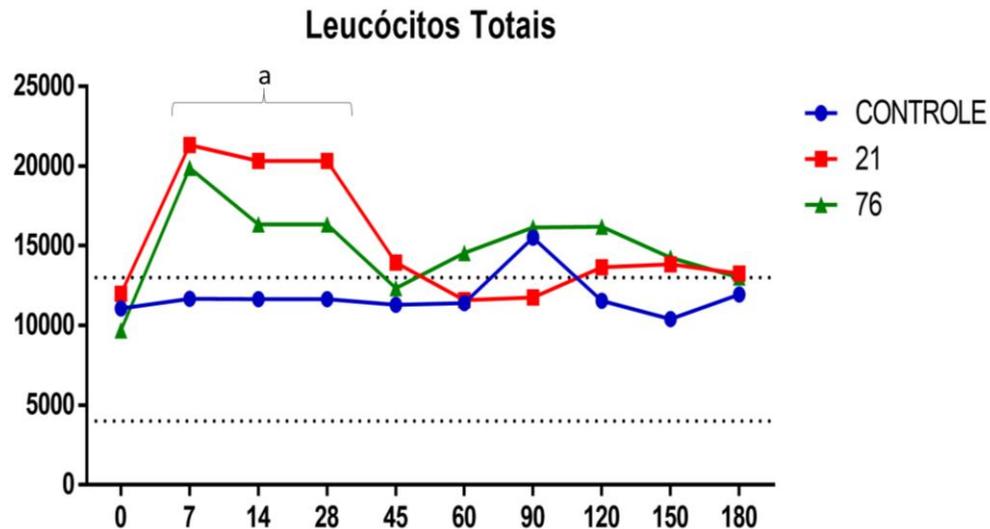


Figura 2. Perfil de leucócitos totais observados ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) - infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.



Na Figura 4 está descrito o perfil de linfócitos, a sua contagem não teve diferença significativa entre os grupos, e os valores permaneceram com seus parâmetros normais para animais com infecção bacteriana. No tempo 90 dias observa-se uma queda nos linfócitos dos grupos (2)21 e (3)76 e uma maior quantidade de linfócitos no grupo controle, bem como no tempo 120, os linfócitos do grupo 21 e 76 diminuíram um pouco mais para em seguida aumentar no tempo 150 dias. Esses valores estão de acordo com os encontrados por Oliveira et al. (2012), quando pesquisaram caprinos saudáveis da mesma raça que os animais deste estudo. Assim como, os valores encontrados por Odhah et al. (2017), utilizando cabras infectadas, descrevem que esses resultados são relacionados à patologia causada pelo *C. pseudotuberculosis* ou por resposta do hospedeiro a esse patógeno, observando que infecções agudas bacterianas são geralmente associadas à neutrofilia, enquanto as infecções crônicas podem levar a linfocitose.

Figura 3. Perfil de neutrófilos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) – infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatística significativa, segundo o teste de ANOVA. Entre “b” e “c” - $p < 0,05$.

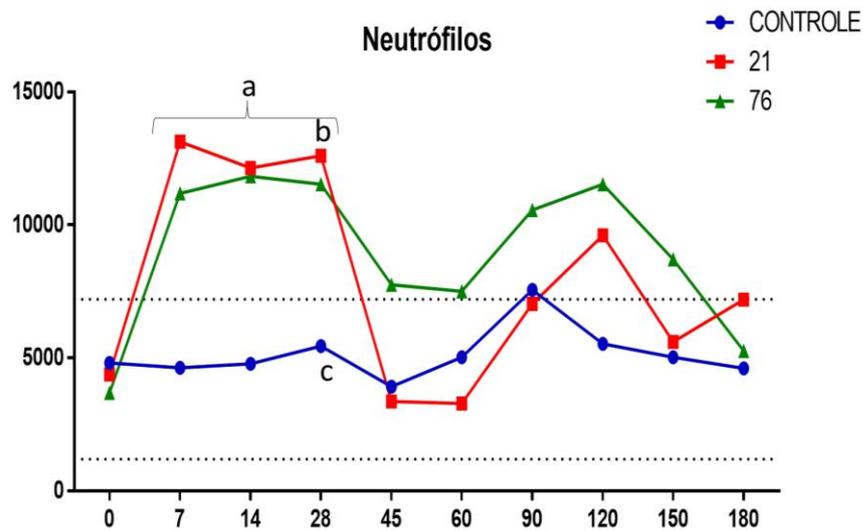
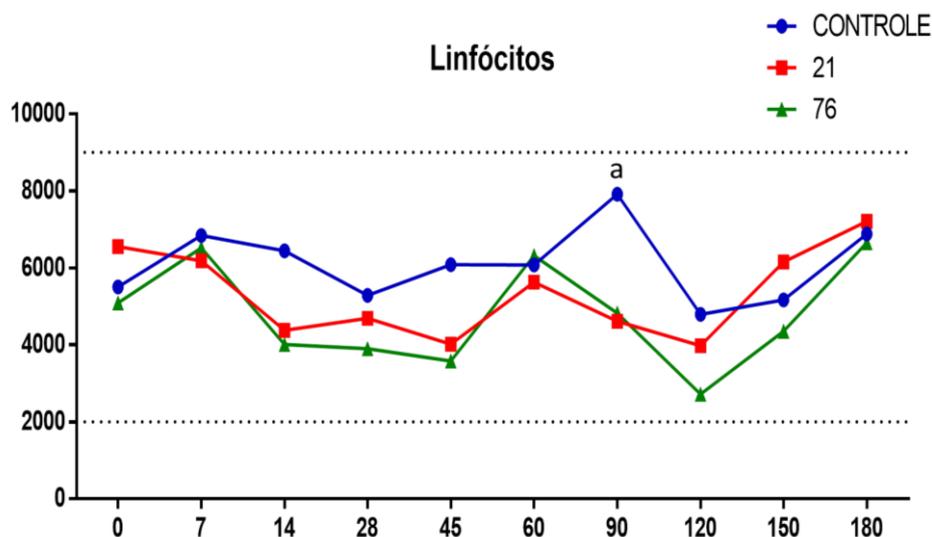
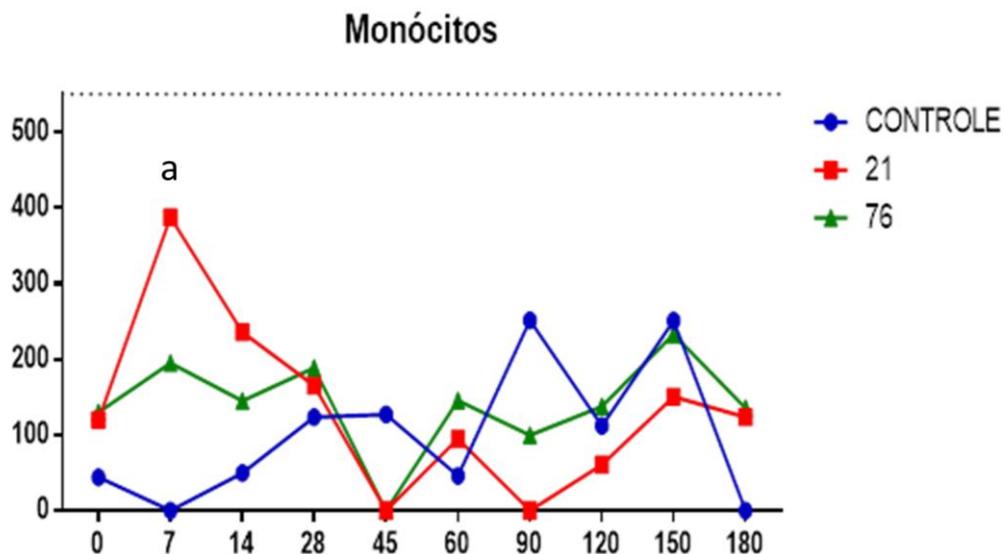


Figura 4. Perfil de linfócitos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) – infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.



Na Figura 5 estão descritos os valores encontrados para os monócitos. Nessa figura observa-se que na infecção aguda há uma elevação dessas células nos grupos infectados. Esse resultado também foi confirmado por Mahmood et al., (2015), quando desafiou caprinos com *C. pseudotuberculosis* e a exotoxina PLD, onde observaram alterações significativas para leucócitos totais devido ao aumento de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. Já na infecção crônica, os monócitos circulantes são recrutados para a área da inflamação, transformando-se em macrófagos teciduais. Esse mecanismo acontece por ativação de células T, onde vão produzir citocinas como o IFN- γ . As citocinas são essenciais para que os macrófagos possam desempenhar suas funções de ligação entre as respostas imune inata e adaptativa (GEISSMANN et al., 2003).

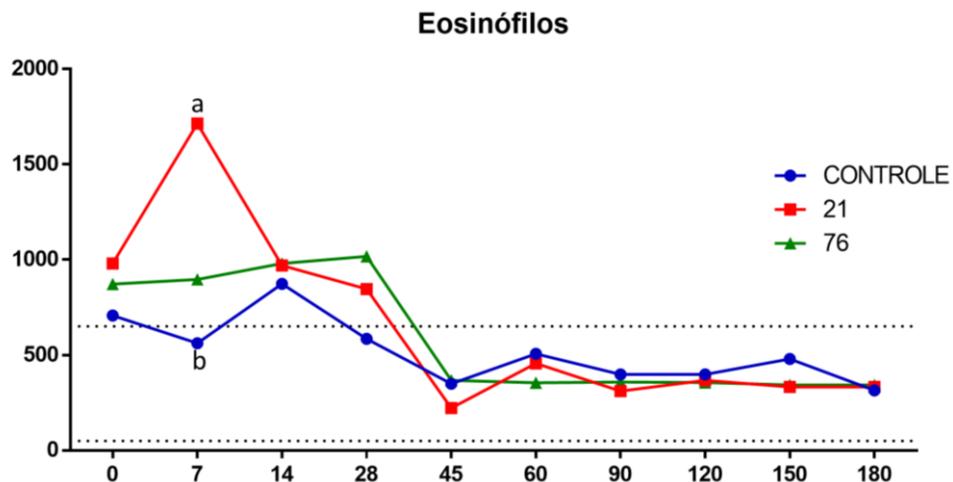
Figura 5. Perfil de monócitos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) - infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.



Observando a Figura 6, podemos inferir que os eosinófilos apresentaram uma diferença estatística entre o tempo 7 do grupo 21 e o grupo controle do mesmo tempo. Esse resultado pode ser explicado através da avaliação parasitológica realizada em todos os tempos, quando se analisou a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) dos animais do grupo 21 observou-se que o animal 75 continha ovos

de *Haemonchus contortus* e do gênero *Eimeria*, o que foi correlacionado com uma maior quantidade para a contagem de eosinófilo para esse animal, pois os eosinófilos desempenham importante papel parasiticida (SOUZA et al., 2006). Outra alteração observada foi à diarreia provocada pela introdução de alimento concentrado na dieta desses animais até a sua adaptação, o que mostra que no tempo zero todos os animais possuíam uma quantidade de células eosinófilas um pouco acima dos parâmetros. Depois desse período de adaptação os valores foram estabilizando até níveis normais (MAHMOOD et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012).

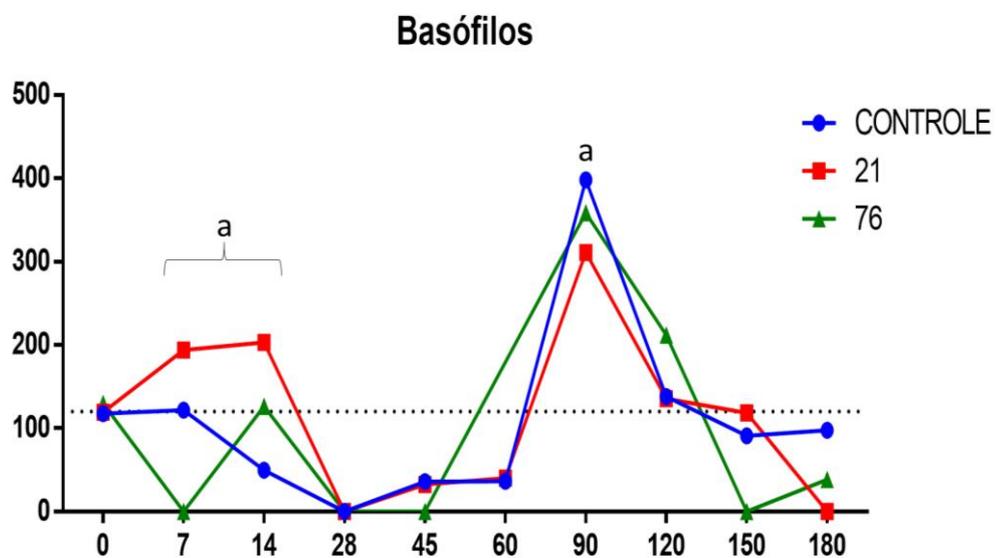
Figura 6. Perfil de eosinófilos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) – infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatística significativa, segundo o teste de ANOVA. Entre “a” e “b” - $p < 0,05$.



Na Figura 7 observa-se o perfil de células basófilas, onde existe um aumento dessas células na infecção aguda nos tempos 7 e 14, porém seu maior aumento na contagem dos basófilos acontece no tempo 90. Esses resultados não são concordantes com os descritos por Ibtisam, (2008), onde durante infecção de *C. pseudotuberculosis* não foram encontradas diferenças significativas em contagem de basófilos. Porém esse resultado está de acordo com Mahmood et al. (2015), quando infectaram a mesma bactéria em caprinos. O aumento significativo de basófilos na

infecção crônica é mediado por resposta imune celular (NAKANISHI, 2010), o que aparentemente não se observou neste experimento.

Figura 7. Perfil de basófilos observado ao longo de 180 dias. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) - infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. Letra sobrescrita diferente indica que houve diferença em relação ao grupo controle.



4. CONCLUSÕES

Em relação aos dados clínicos dos animais foi possível observar a presença de lesões em todos os animais infectados experimentalmente por *C. pseudotuberculosis*, concluindo-se que a cepa produtora de biofilme é mais resistente à defesa do hospedeiro, causando maiores danos nos animais.

Para as condições de infecção experimental, os valores do hemograma estão dentro da normalidade, ocorrendo um aumento nos leucócitos totais e neutrófilos na infecção aguda, e destes últimos na fase crônica, o que pode ser consequente de uma reinfeção, principalmente nos animais infectados com a cepa produtora de biofilme, sugerindo sua maior virulência.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. S. L., AZEVEDO, S. S., TELES, J. A. A., HIGINO, S. S. S., AZEVEDO, E. O. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 116-120, 2012.
- BAIRD, G. J., FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n.4, p. 179-210, 2007.
- CLARY, G., SASINDRAN, S., NESBITT, N., MASON, L., COLE, S., AZAD, A., McCOY, K., SCHLESINGER, L. S., HALL-STOODLEY, L. *Mycobacterium abscessus* Smooth And Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes But Are Killed by Acetic Acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 01782-17, 2018.
- FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1, p. 42-48, 2008.
- FORESTIER, C., BILLARD, E., MILON, G., GUEIRARD, P. Unveiling and Characterizing Early Bilateral Interactions between Biofilm and the Mouse Innate Immune System. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2309. p. 1-7, 2017.
- GEISSMANN, F., JUNG, S., LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v.19, n. 1, p. 71-82, 2003.
- IBTISAM, M. A. Some clinicopathological and pathological studies of *C. ovis* infection in sheep. **Egyptain Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology**, v. 21, n.1, p. 327-343, 2008.
- MAHMOOD, Z. K. H., JESSE, F. F., SAHAREE, A. A., JASNI, S., YUSOFF, R., WAHID, H. Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (phospholipase D): A comprehensive study in goat. **Veterinary World**, v. 8, n. 9, p.1105-1117, 2015.
- MOURA-COSTA, L. F., *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista Ciências Médicas Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2002.
- NAKANISHI, K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 814-820, 2010.
- NDOUTAMIA G., GANDA K. Determination des paramètres hematologiques et biochimiques des petits ruminants du Tchad. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 156, n. 4, p. 202-206, 2005.
- ODHAH, M. N., ABDULLAH, F. F. J., HARON, A. W., LILA, M. A. M., ZAMRI-SAAD, M., KHUDER, Z., HAMBALI, I. U. UMAR, M., SALEH, W. M. Hemogram responses in

goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogen mycolic acids. **Veterinary World**, v. 10, n. 6, p. 655- 661, 2017.

OLIVEIRA, M. G., NUNES, T. L., PAIVA, A. L., BEZERRA, T. C., FERNANDES, N. S., VALE, A. M. BARRETO JUNIOR, R. A., PAULA, V. V. Aspectos hematológicos de caprinos (*Capra hircus*) da raça Canindé criados no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 0, p. 4-8, 2012.

SAMPAIO, P. G. **Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFBA – Salvador, p. 47, 2012.

SOUZA, C., DOS ANJOS LOPES, S. T., BATINA, P. N., CECIM, M., CUNHA, C. M., DE CARVALHO CONRADO, A., BECK, A. Estresse parasitário em cabras Saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 17-23, 2006.

SOUZA, M. F., CARVALHO, AA. Q., GARINO JR, F., RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011.

7. CAPÍTULO IV

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAPRINOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM CEPAS DE
Corynebacterium pseudotuberculosis PRODUTORA E NÃO
PRODUTORA DE BIOFILME**

RESUMO

O diagnóstico para Linfadenite Caseosa é realizado através da observação clínica e testes sorológicos. Dentre os testes sorológicos o mais usado é o ELISA (ensaio imunoenzimático), este teste é eficaz e tem uma boa acurácia. Para isso é necessário que a sensibilização seja realizada com um antígeno específico com alta ligação antígeno-anticorpo. O antígeno secretado BHI é o padrão para testes diagnósticos, mas se faz necessário testar outros antígenos a fim de estabelecer uma melhor sensibilidade e especificidade. Assim, na busca de padronizar outros antígenos, este trabalho objetivou avaliar a resposta imune humoral e celular relacionada às moléculas antigênicas extraídas de isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, em caprinos infectados e não infectados com *C. pseudotuberculosis* produtora e não produtora de biofilme, buscando moléculas para o desenvolvimento de diagnóstico em Linfadenite Caseosa. Assim, foram extraídos antígenos de membrana de duas cepas de *C. pseudotuberculosis* produtora e não produtora de biofilme e antígeno secretado pelo meio sintético quimicamente definido (MQD) das mesmas cepas, bem como proteínas recombinantes (NanH, PknG, SodC e SpaC) foram produzidas para teste de ELISA e *immunoblotting*. O antígeno secretado pelo método de partição em três fases (TPP) foi produzido para sensibilizar a cultura de sangue total para analisar a imunidade celular através do IFN- γ . Também foi feito o teste de tuberculinização (TCC). Para isso foi realizado um experimento *in vivo* com 18 caprinos da raça Canindé, que foram infectados experimentalmente com as cepas bacterianas já relacionadas. As proteínas recombinantes NanH, SodC, PknG e SpaC, confirmaram seus pesos em 72 kDa, 18 kDa, 83 kDa e 86 kDa, respectivamente. Para o teste do ELISA a melhor sensibilidade e especificidade ocorreu para a proteína recombinante SodC com 100%. Os demais antígenos apresentaram sensibilidade acima de 80%, com exceção da proteína SpaC que teve a sensibilidade apresentada em 78,8%. O antígeno BHI fez a soroconversão do IgG a partir de 14 dias após a infecção. No *Western blotting*, os antígenos da fração de superfície F3 21 e F3 76, apresentaram uma banda expressiva em todos os *pools* soros com tamanho entre 64 e 70 kDa. A produção de IFN- γ mostra uma tendência de maior produção nos caprinos infectados com a bactéria produtora de biofilme, estimulado pelo antígeno TPP 76. No TCC, o teste realizado mostra que todos os animais não apresentaram reatividade, embora tenham apresentado reatividade para o TCC de *Mycobacterium avium*, conforme o aumento do edema no local do teste. Esses resultados proporcionam uma melhor compreensão sobre a antigenicidade de cepas produtora e não produtora de biofilme.

Palavras-chave: Antigenicidade, caprino, proteína recombinante, imunidade humoral, imunidade celular.

1. INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é responsável por grandes perdas econômicas nos rebanhos de caprinos e ovinos no mundo, principalmente aqueles que possuem um grande efetivo. Assim, vários estudos já foram desenvolvidos na busca de uma melhor prevenção dessa doença, principalmente no desenvolvimento de testes diagnósticos com acurácia e a tentativa de produzir vacinas eficazes para impedir uma possível contaminação de animais não infectados nos rebanhos (BAIRD; MALONE, 2010; CARMINATI et al., 2003; MEYER et al., 2005; VALE et al., 2003).

O diagnóstico para LC é realizado através do isolamento da bactéria, sinais clínicos e testes sorológicos. Para a doença subclínica, os testes sorológicos são essenciais, já que os animais não apresentam nenhum sintoma aparente (MEYER et al., 2005). Dentre os testes sorológicos o mais utilizado é o ELISA (ensaio imunoenzimático). O teste é capaz de discriminar animais positivos de animais negativos, com uma sensibilidade e especificidade próximo de 100% (REBOUÇAS et al., 2013).

Para obter essa especificidade e sensibilidade é necessária a padronização de antígenos, sendo o melhor aquele imunodominante, que seja reconhecido pela maioria dos soros de animais infectados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (HOLZLE et al., 2013). Alguns estudos nesse sentido já foram realizados, tendo sido o teste ELISA com antígenos secretados no meio BHI (*Brain Heart Infusion*), que utiliza este meio diluído, onde esta bactéria é previamente cultivada e depois removida, padronizado por Carminati et al., (2003), no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Também neste Laboratório, o teste ELISA com antígenos secretados no meio MQD (meio sintético quimicamente definido) foi desenvolvido por Moura-Costa et al. (2002), obtendo bons resultados de especificidade e sensibilidade.

Na busca de identificar outros antígenos, bem como de utilizá-los na avaliação da resposta imune humoral e celular em caprinos infectados e não infectados com cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme, este trabalhou efetuou experimentos com antígenos obtidos por meios

tradicionais e já testados, obtidos a partir de cepas que já vem sendo utilizadas neste Laboratório, a partir das referidas cepas produtoras ou não de biofilme, bem como novos possíveis alvos antigênicos e recombinantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Comissão de Ética no Uso de Animais

Esse experimento foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA - ICS) sob o número 123/2017.

2.2. Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA e na Estação experimental de pequenos ruminantes - UFBA de Salinas de Margarida-BA, localizada a latitude 12°52'16" e longitude 38°45'52", clima tropical úmido e temperatura média de 3° °C.

2.3. Cepas de *C. pseudotuberculosis*

Foram selecionados dois isolados de *C. pseudotuberculosis* provenientes de caprinos, sendo uma estirpe (CapJ4 (76) - forte produtora de biofilme e outra estirpe Cap3W (21) - negativa para produção de biofilme). Esses isolados são originários da Região de Petrolina-PE.

2.4. Cultivo bacteriano de isolados e contagem de células para inoculação em caprinos

As amostras foram cultivadas em 200 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), por 48 horas em estufa a 37 °C. Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 6 000 rpm, desprezando o sobrenadante e acrescentando 10 mL de solução salina estéril para ressuspender todo o *pellet*. Em seguida foi retirado 1 mL da cultura bacteriana, lavado duas vezes com solução salina, centrifugando por 5

minutos a 5.000 rpm. Depois de desprezar o sobrenadante foi adicionado *Sybr Safe* (Invitrogen), corante para marcar as células bacterianas, diluído 1:20 e incubado por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Depois foi realizada nova lavagem para remoção do reagente e ressuscitado com 1 mL de solução salina. Em seguida foram retirados 50 µL da suspensão bacteriana e acrescido de 450 µL de solução salina, em tubos com *Beads trucount* (BD Biosciences) para realizar a contagem do inóculo por mensuração em citometria de fluxo. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo: bactérias totais= (nº eventos bactérias/ nº eventos *beads*) x nº de *beads* por µL (constante no lote) (SAMPAIO, 2012).

2.5. Cultivo bacteriano para preparo de antígeno BHI

O protocolo de produção deste antígeno foi realizado segundo Carminati et al. (2003), utilizando a linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*. O cultivo foi realizado em 200 mL de caldo BHI, por 48 horas em estufa a 37 °C. Após esse período, o cultivo foi analisado quanto à sua pureza e foram centrifugados por 30 minutos a 6.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e congelado à temperatura de -20 °C.

2.6. Extração de componentes somáticos hidrofóbicos com solvente orgânico

Após o cultivo bacteriano em meio BHI, centrifugou-se este meio a 6.000 rpm 20 min a 4°C e o *pellet* lavado 2 vezes com PBS (Tampão fosfato-salino). As massas bacterianas dos isolados 21 e 76 foram ajustadas para o peso de 2 g e ressuscitadas em 10 mL de PBS, sonicadas a 60 Hz (cinco ciclos de 60 s). O material foi submetido à extração por três vezes com 35 mL de clorofórmio-metanol-água (5/10/4, v/v/v) por 4 horas sob agitação, seguida de centrifugação a 6.000 rpm por 20 min a 4°C; os sobrenadantes resultantes foram reunidos e o volume final foi reduzido por *Speed Vacum Concentrator Plus* (Eppendorf®). Esta concentração foi submetida à extração com 30 mL butanol-água (1/1, v/v) por uma hora, para extrair uma fase butanólica e uma fase aquosa, as quais foram nomeadas F1 e F2, respectivamente; a fração F2 foi submetida por este procedimento mais duas vezes, e as soluções finais foram concentradas por *Speed Vacum*. O sedimento obtido

após a extração de clorofórmio-metanol-água foi extraído três vezes com 35 mL de 9% butanol em água por 3 horas sob agitação, seguida de centrifugação a 6.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram reunidos e concentrados, resultando em Antígenos de superfície (F3) (Adaptado de BASTOS, 2011). A concentração proteica das frações foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia), utilizando soro albumina bovina como padrão. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

2.7. Produção de antígeno secretado concentrado pelo método de partição de três fases (TPP)

Para a produção das proteínas secretadas pelo método TPP, as cepas 21 e 76 foram cultivadas em 1 litro de meio BHI, a 37 °C por 72 horas, em seguida utilizou-se o protocolo de extração e concentração das proteínas estabelecido por Paule et al., (2004). A concentração proteica das frações foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia), utilizando-se soro albumina bovina como padrão. As amostras foram armazenadas a - 20 °C.

2.8. Produção de antígenos secretados em meio sintético quimicamente definido (MQD)

Os isolados 21 e 76 foram cultivados em caldo BHI 48 horas. Depois o inóculo foi centrifugado a 6,000 rpm por 20 minutos, onde o sedimento bacteriano foi ressuspensão em PBS estéril e adicionado a 1 litro do meio sintético quimicamente definido, descrito por Moura-Costa et al., (2002). A cultura foi mantida a 37 °C por 72 horas, sendo centrifugada a 6.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado a vácuo em membrana *Millipore* 0,22 µm. Depois esse sobrenadante foi liofilizado e ressuspensão em PBS. A concentração proteica das frações foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia), utilizando-se soro albumina bovina como padrão. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

2.9. Produção de proteínas recombinantes de *C. pseudotuberculosis* em *E. coli*

Os genes que codificam as proteínas SpaC, NanH, SodC e PknG de *C. pseudotuberculosis* foram selecionados e submetidos ao desenho de versões sintéticas, com otimização de códons para expressão em sistemas heterólogos. A síntese dos genes foi realizada pela empresa DNA2.0[®](Califórnia, USA), a qual realizou a clonagem dos mesmos no vetor pD444-NH. Este vetor fusiona seis resíduos de histidina à proteína heteróloga, possibilitando a sua purificação por cromatografia de afinidade (Ni-Sepharose). Os vetores recombinantes pD444-NH/*spaC*, pD444-NH/*nanH*, pD444-NH/*sodC* e pD444-NH/*pknG* foram usados para transformar cepas de *Escherichia coli* [*E. coli* BL21(DE3)]. As proteínas recombinantes SpaC (rSpaC), NanH (rNanH), SodC (rSodC) e PknG (rPknG) foram expressas e purificadas por cromatografia de afinidade como previamente descrito (MARCHIORO et al., 2012; SIMIONATTO et al., 2010). Resumidamente, cepas de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o vetor recombinante por choque térmico. O clone foi cultivado em caldo Luria-Bertani (LB-Difco) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina até a fase log de crescimento ($DO_{600}=0,6-0,8$) em agitador orbital (37 °C, 250 rpm). A expressão foi induzida por 4 h com 0,5 mM de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich). *Pellets* das culturas foram obtidos por centrifugação a 6.000 $\times g$ por 10 minutos, a 4 °C, ressuspensos em PBS, sonificados e após nova centrifugação ressuspensos em tampão de lise (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazole 5 mM e Lauroyl sarcosine 0,2 %) e mantidos sob agitação por 72 h a 4 °C. Esta solução foi centrifugada a 10.000 $\times g$ por 60 min a 4 °C. O sobrenadante, após filtração em membrana 0,8 µm, foi submetido à purificação por cromatografia de afinidade em uma coluna de Ni-Sepharose (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante. A proteína recombinante foi eluída com concentrações crescentes de imidazole, e dialisadas em PBS pH 7,4, concentradas e quantificadas com o kit BCA[™] Protein Assay (Pierce), seguindo instruções do fabricante. A pureza dos antígenos recombinantes foi avaliada por SDS-PAGE 12%.

2.9.1 Avaliação das proteínas recombinantes

A antigenicidade das proteínas recombinantes foi avaliada por *Western blot* e ELISA utilizando anticorpos monoclonais (MAb) anti-histidina (Sigma-Aldrich) e soros de caprinos experimentalmente infectados pelo *C. pseudotuberculosis*.

No *Western blot* as proteínas recombinantes foram separadas em gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, bloqueadas e incubadas com *pool* de soro de animais experimentalmente infectados diluídos 1:50 ou MAb anti-histidina diluído 1:10.000. Em seguida, as membranas foram lavadas e confrontadas com anticorpos secundários anti-caprino conjugados com peroxidase diluído 1:500. A reação foi revelada com cromógeno 4-cloro- α -naftol adicionado de substrato peróxido de hidrogênio.

No ELISA indireto placas de poliestireno de 96 poços (Polysorp, Nunc) foram revestidas com 10 e 50 ng de cada uma das proteínas recombinantes (estabelecidos por padronização prévia) diluídas em 0,05 M de tampão de carbonato/bicarbonato (pH 9,6). As placas foram lavadas com PBS 0,01 M, 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado. Após lavagens com PBS-T, os soros diluídos 1:100 foram adicionados e incubados. Após nova lavagem foi adicionado o anticorpos secundário conjugado com peroxidase diluído 1:10.000. A revelação foi realizada com 50 μ l do substrato de 1:2-o-fenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich). A densidade óptica média (DO) a 492 nm foi determinada utilizando um leitor de placas de microtitulação (THERMO PLACA).

2.10. Caprinos

Foram utilizados no experimento 18 caprinos da raça canindé com idade média de seis meses, provenientes de áreas consideradas não-endêmicas para Linfadenite Caseosa. Os animais foram submetidos à anamnese e exame clínico, procedendo-se a obtenção de sangue para realização de sorologia para *C. pseudotuberculosis*, antes de chegarem à Unidade Experimental em Salinas da Margarida – BA. Foi realizada sorologia para LC, para assegurar a soro negatividade dos animais no início do experimento. Todos os animais foram tratados com anti-helmíntico antes do início do experimento. Durante o período experimental, os

caprinos foram alimentados com feno, além de suplementação mineral e proteica e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em três grupos. O grupo 1 (controle) (n=6) fêmeas, inoculadas apenas com solução salina 0,9%. O grupo 2 (n=6) machos inoculados com a cepa Cap3W (21). O grupo 3 (n=6) machos inoculados com a cepa CapJ4(76). A Tabela 1 apresenta a distribuição destes animais nos três grupos. A inoculação dos animais foi realizada com 1 mL de solução salina contendo 2×10^6 UFC de *C. pseudotuberculosis*. Todas as inoculações foram realizadas por via subcutânea, na região pré-escapular direita do animal.

Tabela 1. Distribuição de animais nos três grupos experimentais: Grupo 1 - Controle; Grupo 2 - Infectado experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme (21) e Grupo 3 - Infectado experimentalmente com cepa de *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme (76)

Grupo 1 (Controle)	Grupo 2 (21)	Grupo 3 (76)
Animal nº 51	Animal nº 60	Animal nº 57
Animal nº 52	Animal nº 63	Animal nº 58
Animal nº 53	Animal nº 69	Animal nº 59
Animal nº 54	Animal nº 72	Animal nº 61
Animal nº 55	Animal nº 75	Animal nº 65
Animal nº 56	Animal nº 79	Animal nº 67

2.11. Colheita de sangue

Amostras de sangue de cada caprino foram colhidas por venopunção da jugular externa e conservadas em tubos estéreis. Sendo 4 mL em tubo sem coagulante para uso em sorologia, e 9 mL em tubo com heparina para cultura celular. As coletas foram realizadas antes das inoculações (tempo zero), e nos dias 7, 14, 28, 45, 60, 90, 120 e 180 dias. Em cada tempo de coleta, os animais foram examinados clinicamente, realizando-se a inspeção dos diversos linfonodos superficiais. Após o período de 180 dias de observação, os animais foram abatidos tecnicamente no abatedouro Frigoalas (Alagoinhas-BA) para realização da inspeção

anátomo-patológica *post-mortem*, verificando-se a presença de lesões características de infecção por *C. pseudotuberculosis*.

2.12. Caracterizações da aplicabilidade dos Antígenos de superfície em sistema de ELISA indireto

Como modelo de ensaio imunoenzimático, foi utilizado o teste ELISA indireto descrito por Guimarães et al., (2009), aplicado na detecção de anticorpos IgG específicos anti-*C. pseudotuberculosis* em caprinos. As placas foram sensibilizadas com as soluções dos antígenos de superfície (F3) das duas cepas avaliadas: uma produtora de biofilme (76) e outra não produtora de biofilme (21), bem como os dois antígenos cultivados em MQD, ajustadas nas concentrações 0,5 µL/mL, diluída em 1:100, em tampão carbonato bicarbonato, sendo incubadas a 4°C por 16 horas. A etapa do bloqueio foi conduzida com PBS/leite em pó desnatado 5% com PBS 0,05% Tween-20 (PBS-T) por duas horas. Sendo usada uma amostra de soro caprino como controle positivo (CP) e uma amostra de soro caprino como controle negativo (CN) e demais soros pesquisados diluídos em PBS-T contendo 1% de caseína hidrolisada na proporção de 1:100 e incubados por 1 hora. Após lavagens em PBS-T, utilizou-se imunoglobulina anti-IgG caprina conjugada a peroxidase (*Imunity*) na concentração de 1:10.000, e após incubação a 37 °C por 45 minutos, a revelação com o cromógeno orto-fenilenodiamina (OPD) (Sigma®), sendo a reação interrompida pela adição de H₂SO₄. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (*Thermo scientific multiscan 60*) utilizando-se filtro de 492 nm de comprimento de luz. Os testes foram conduzidos em duplicata.

2.13. Caracterização do perfil eletroforético e do reconhecimento antigênico por IgG

As frações obtidas foram submetidas ao procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE); posteriormente, os géis foram corados com azul de coomassie, sendo outro gel eletrotransferidos para uma membrana de nitrocelulose e realizado o *western blotting*. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS-T acrescido de 5% de

soroalbumina bovina por 12 horas a 4°C; em seguida, foi incubada a 37°C por 1 h com *pool* de soros de cada grupo experimental, usando uma amostra positiva para *C. pseudotuberculosis* como controle. Os soros foram diluídos 1:50 em PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado. Foram utilizados os anticorpos de detecção anti-IgG de caprinos conjugados com peroxidase (Southern Biotech) diluídos em PBS-T na proporção de 1:100, sendo também incubados por uma hora. A revelação foi realizada com o cromógeno 4-cloro- α -naftol, adicionado de substrato peróxido de hidrogênio.

2.14. Quantificação da produção *in vitro* de IFN- γ por células sanguíneas

A quantificação da produção *in vitro* de Interferon-gama (IFN- γ) foi desenvolvida conforme Rebouças et al. (2011). As amostras de sangue colhidas em cada tempo amostral foram coletadas em tubo de 9 mL com heparina e a cultura total de sangue periférico foi cultivada em placas de cultivo de 24 poços por 24 horas a 37 °C em estufa de CO₂, sendo cada quatro poços correspondentes a um animal. O primeiro poço corresponde ao controle negativo, sem adição de estímulo; o segundo poço correspondeu ao controle positivo, sendo adicionado 5 μ L de mitógeno *pokeweed* (PWM); o terceiro poço foi estimulado com o antígeno obtido por TPP, da cepa 21 com um volume de 37,55 μ L na concentração de 25 μ g/mL e o quarto poço foi adicionado o antígeno TPP da cepa 76, no volume de 14,45 μ L, na concentração de 25 μ g/mL. O sobrenadante foi coletado após centrifugação das amostras por 5 minutos a 3.000 g, estocado a -70 °C para ser avaliada a produção de INF- γ através de teste comercial imunoenzimático específico (Mabtech, Suécia).

2.15. Teste de tuberculinização – Teste Cervical Comparativo (TCC)

A metodologia utilizada para a realização do teste cervical comparativo seguiu a técnica descrita no Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT (BRASIL, 2006).

Foram utilizadas as tuberculinas PPD (*Purified Protein Derivate* – Derivado Proteico Purificado) bovina e aviária, produzidas segundo as normas do Ministério

da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O teste consiste por meio da inoculação intradérmica de 0,1 mL de tuberculina PPD bovina, na parte cervical do animal. A espessura da dobra da pele foi determinada com o auxílio de paquímetro antes da inoculação. A leitura foi realizada 72 horas após a inoculação da tuberculina e consiste na comparação da prega inoculada com a do lado oposto, por meio visual, apalpação e mensuração com paquímetro. O aumento da espessura da dobra da pele foi calculado subtraindo da medida da dobra da pele 72 horas após a inoculação, à medida da dobra da pele tomada no dia da inoculação da tuberculina PPD aviária (ΔA) e da tuberculina PPD bovina (ΔB). A diferença de aumento da dobra da pele provocada pela inoculação da tuberculina PPD aviária (ΔA) e da tuberculina PPD bovina (ΔB) foi calculada subtraindo-se ($\Delta B - \Delta A$). Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios definidos no regulamento Técnico do PNCEBT.

2.16. Estatística

O ponto de corte do ensaio imunoenzimático do ELISA foi definido através da curva ROC (*receiver operatos characteristic*) ou curva operacional relativa. Esta análise baseia-se numa curva na qual os valores de corte têm no eixo das ordenadas a sensibilidade e no eixo das abscissas a especificidade. Os testes estatísticos utilizados foram através do programa SPSS versão 23 para Windows.

Para análise da produção de INF- γ , foi utilizado para dados separados por grupo e estímulo e para dados separados por grupo o teste não paramétrico de Friedman com pós-teste Dunn`s. Para análise de dados separados por estímulo: teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn`s.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram quantificados os antígenos proteicos pela metodologia do Lowry e estes foram utilizados para a realização do teste de ELISA, para estimulação *in vitro* da produção de IFN- γ e para o *western blotting*. Os resultados destas quantificações estão apresentados na Tabela 2. Essas concentrações foram calculadas e o volume individualizado para uniformizar a concentração específica para cada metodologia.

Tabela 2: Quantificação proteica da fração do antígeno de superfície (F3) extraída com butanol a 9%, meio sintético quimicamente definido (MQD) e partição de três fases (TPP), concentração mensurada em mg/mL.

Amostras	F3 p/ ELISA	F3 P/ WB	TPP	MQD
21	0,280	0,556	0,666	5,789
76	0,173	1,282	1,730	4,405

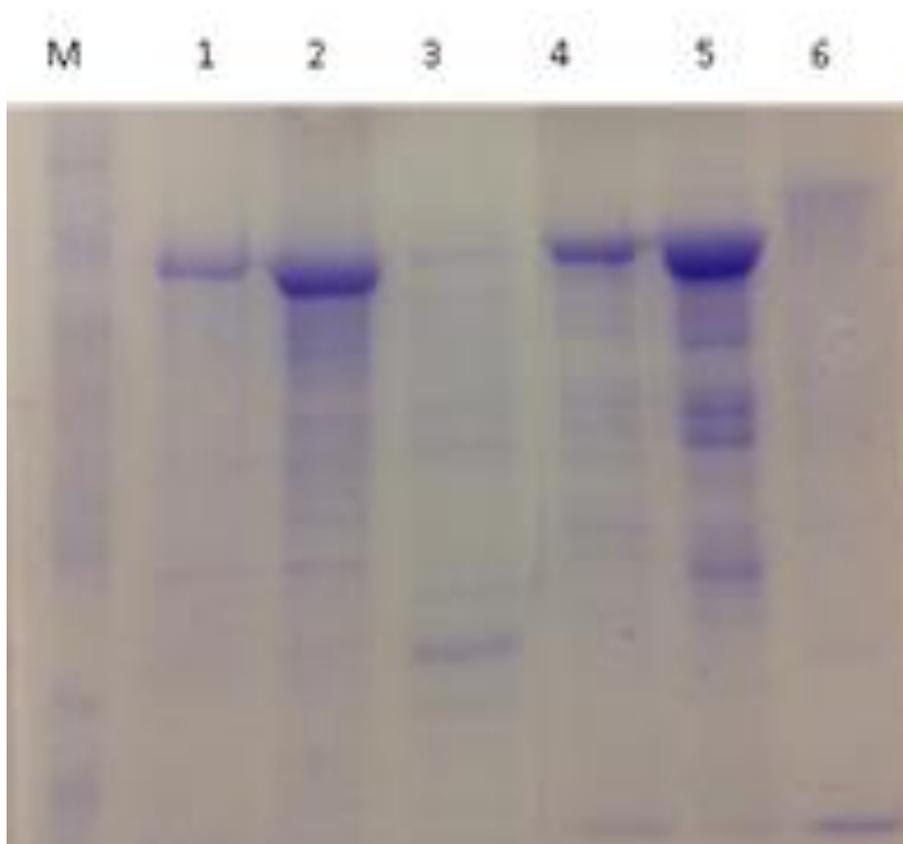
Em relação aos antígenos proteicos recombinantes após a expressão foi realizado um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% corado com Comassie blue, para verificação de suas bandas proteicas, de acordo com a Figura 1. As proteínas NanH, SodC, PknG e SpaC, confirmaram seus pesos em 72 kDa, 18 kDa, 83 kDa e 86 kDa, respectivamente. Essas proteínas foram descritas por Trost e el., 2010, que descreve a spaC como uma adesina (pilina) bacteriana, a sodC, uma enzima superóxido-dimetase dependente de cobre, e são relacionadas a mecanismo de proteção contra a geração de reativos de oxido nítrico. Já a NanH é uma neuramidase H, envolvida com o reconhecimento de ácido siálico na superfície de células do hospedeiro. A PknG, uma serina-treonina proteína cinase, que em micobactérias está envolvida com a maturação do fagolisossomo. Por isso, o estudo dessas proteínas é importante, visto que elas são certamente fatores de virulência envolvidos na relação com o hospedeiro.

Esse gel revela bandas características das proteínas de acordo com estudos realizados por Santana-Jorge, et al., 2016, que avaliou essas proteínas na cepa *C. pseudotuberculosis* FRC41, onde observaram que essas moléculas são estáveis e possuem similaridade com as mesma proteínas de outras cepas já estudadas.

A partir das coletas de sangue dos três grupos experimentais, foram realizadas várias metodologias para acompanhamento da resposta imune por estes animais. A cinética da produção de IgG (imunoglobulina G) anti-*C. pseudotuberculosis*, foi observada ao longo de 180 dias do experimento, realizando-se o ELISA indireto (ensaio de imunoabsorção enzimática) para o acompanhamento dessa titulação nos animais. O ELISA foi realizado com nove antígenos diferentes para avaliar a sua antigenicidade, sendo o antígeno BHI, utilizado como padrão, visto que é o antígeno já padronizado (CARMINATI et al., 2003) e rotineiramente

utilizado no Laboratório. Os demais foram extraídos da fração de superfície F3) das cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme (F3 76 e F3 21), produzidos com o meio sintético quimicamente definido com as mesmas cepas, denominados de MQD 21 e MQD 76, e os quatro antígenos de proteínas recombinantes NanH, SodC, PknG e SpaC.

Figura 1. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie blue das proteínas recombinantes nanH, sodC, pknG e spaC.



Legenda: M- Marcador de peso molecular; 1- NanH 72 kDa; 2- NanH 72 kDa; 3- SodC 18 kDa; 4- PknG 83 kDa; 5- PknG 83 kDa; 6 – SpaC 86 kDa.

Os principais parâmetros obtidos com a curva ROC desses testes pode ser observada na Tabela 3, onde mostra o *cut-off* e o percentual de sensibilidade e especificidade. Os conceitos de sensibilidade e especificidade são essenciais no entendimento dos limites do teste do ELISA. A sensibilidade indica a probabilidade de o soro animal positivo estar infectado com *C. pseudotuberculosis* e a especificidade mostra que o soro animal é negativo. Assim, quanto maior sensibilidade, menor o risco de animais falso negativo e quanto maior a

especificidade menor o risco de falso positivo (ADHIKARI et al., 2015). Carminati et al., (2003), utilizando o mesmo antígeno BHI encontraram 100% de especificidade e 93,5% de sensibilidade. No presente estudo foram encontrados 96,3% de sensibilidade e 95,8% para o mesmo antígeno. O resultado inferior da sensibilidade pode ser explicado analisando o resultado do ELISA no grupo controle, onde se observa que os animais 54 e 55 apresentaram densidade óptica (DO) média de 0,347 e 0,352 no tempo 180 dias. Embora separados por baias e utilizando o rigor no controle de limpeza para evitar a contaminação do *C. pseudotuberculosis* nos animais controles, as vias de infecção não puderam ser 100% controladas, uma vez que uma das possibilidades de contágio para os animais no rebanho é através da produção de aerossóis de animais doentes para animais sadios (BAIRD; FONTAINE, 2007; FONTAINE et. al., 2006; FONTAINE; BAIRD, 2008).

O resultado da sensibilidade e especificidade estão de acordo com os resultados de Rezende et al., (2016), quando realizou ELISA com antígenos recombinantes e obteve especificidade de 77,5%, 92,5% e 92,5% e especificidade de 95%, 90% e 85% para os antígenos rCP0126a, rCP0369 e rCP1957 respectivamente.

Tabela 3. Valores obtidos através da curva ROC para os testes ELISA, com os diferentes antígenos utilizados (BHI, F3 21, MQD 21, F3 76 e MQD 76).

Antígenos	Cut-off	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
BHI	0,230	96,3	95,8
F3 21	0,162	92,5	81,2
MQD 21	0,145	83,8	75,0
F3 76	0,287	97,5	93,7
MQD 76	0,111	96,3	93,7
SodC	0,338	100	100
PKnG	0,180	93,8	93,7
NanH	0,183	80	62,5
SpaC	0,112	78,8	31,2

Os antígenos NanH e SpaC apresentaram uma especificidade abaixo do esperado, essa resposta pode ser causada por diversos fatores, sendo o mais provável uma possível reação cruzada entre essas proteínas e outras moléculas produzidas pelas cepas que os animais foram infectados (WILLIAMSON, 2001).

Na Figura 2 constam os resultados do antígeno BHI e nas Figuras 3, 4, 5, 6 e 7, os antígenos F3 21, MQD 21, F3 76, MQD 76 e os antígenos com proteínas recombinantes NanH, SodC, PknG e SpaC, respectivamente. Os valores de absorvância obtidos com o teste do ELISA indireto variaram entre os diferentes antígenos.

O tratamento estatístico dos testes ELISA foi realizado para se avaliar a significância entre grupos infectados experimentalmente e foi observado que no grupo 21 os antígenos F3 21 e MQD 21, no tempo 14 dias, apresentaram valores de DO maiores que aqueles do antígeno F3 76, e que o antígeno F3 76 apresentou maiores valores que o MQD 76. Estes resultados podem decorrer de serem as mesmas cepas, a fonte de infecção e a produtora do antígeno para o teste. Estes mesmos resultados podem ser observado no tempo 28 e 60 para o mesmo grupo infectado (21).

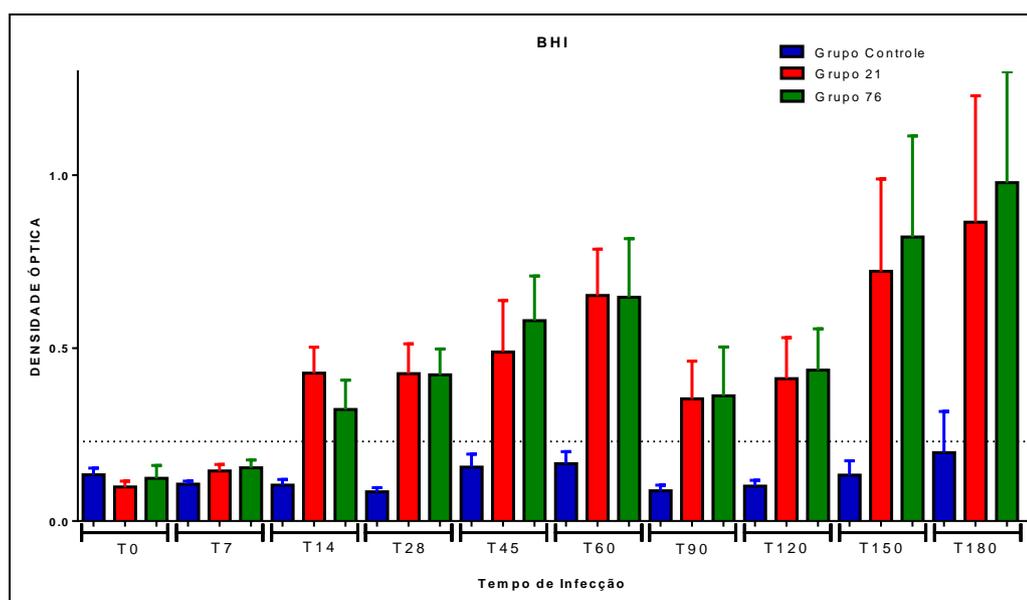
Já quando foi analisado o grupo 76, o resultado do ELISA nos tempos 7 e 14 dias, foi significativo para o antígeno MQD 21 em relação ao antígeno F3 76, da mesma forma que no tempo 45 os antígenos F3 21 e MQD 21 foram significantes em relação ao antígeno F3 76. O antígeno F3 21 também apresentou resultado significativo no tempo 60 dias em relação ao antígeno F3 76.

Observa-se que para o antígeno BHI, a soroconversão do IgG começa a ser realizado a partir de 14 dias após a infecção, observando que o grupo 21 apresentou uma maior resposta que o grupo 76 nos primeiros dias da infecção, enquanto que a soroconversão do grupo 76 vai aumentando à medida que a infecção entra na cronicidade, porém os níveis de anticorpos caem para os dois grupos com 90 dias após a infecção, voltando a crescer com a cronicidade já estabelecida com 180 dias de infecção. Fazendo uma associação com o estágio clínico dos animais, onde se observa que aos 180 dias de infecção o grupo 76 apresentava maior número de animais com lesões, sendo que um dos animais do plantel (57) apresentava perda de peso considerável. Esse resultado pode estar associado com a maior virulência da cepa do grupo 76. O biofilme é um mecanismo de defesa da bactéria que garante a sua sobrevivência em condições inóspitas e ajuda na permanência do micro-organismo intracelular no hospedeiro (CLARY et al., 2018).

Na figura 3, consta o gráfico apresentando o resultado do teste ELISA com o antígeno F3 21, onde mostra similaridade de ocorrências com o antígeno BHI, porém

com menores valores de densidade óptica. A busca por um extrato antigênico para a utilização no teste ELISA indireto, para posterior aplicação de uma estratégia sorológica para estudos de diagnósticos na população, passa por vários cuidados, no que se refere à sensibilidade e especificidade, para melhorar os índices, a fim de evitar a utilização de testes confirmatórios, o que acarreta em custos maiores. A descoberta de propriedades antigênicas é importante para a compreensão de fatores da virulência bacteriana (GALVÃO et al., 2017).

Figura 2. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) - sem infecção experimental; Grupo 21 (n=6) - infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade óptica (DO) 0,230. Placas de poliestireno de 96 cavidades sensibilizado com o antígeno BHI.



Para os antígenos testados, o F3 76 é o que mais se assemelha em relação à sensibilidade e especificidade do ELISA para o antígeno BHI. Segundo Rebouças et al., (2013) o ELISA indireto pode ser empregado em testes sorológicos para detectar Linfadenite Caseosa, resultando num programa de controle e erradicação eficiente, pois o teste em referência poderia detectar com acurácia os animais infectados.

Figura 3. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade ótica (DO) 0,162. ELISA sensibilizado com o antígeno F3 21.

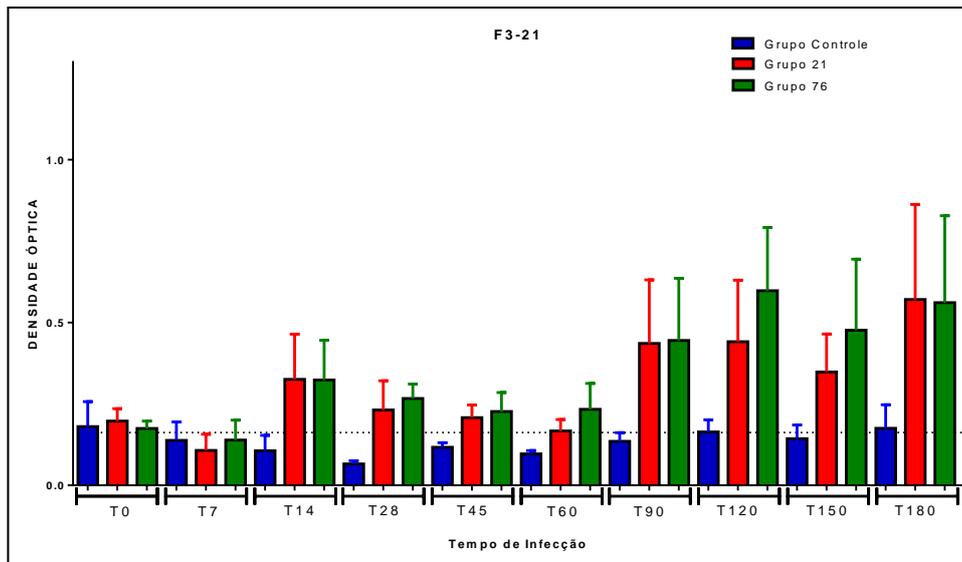


Figura 4. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade ótica (DO) 0,145. ELISA sensibilizado com o antígeno MQD 21.

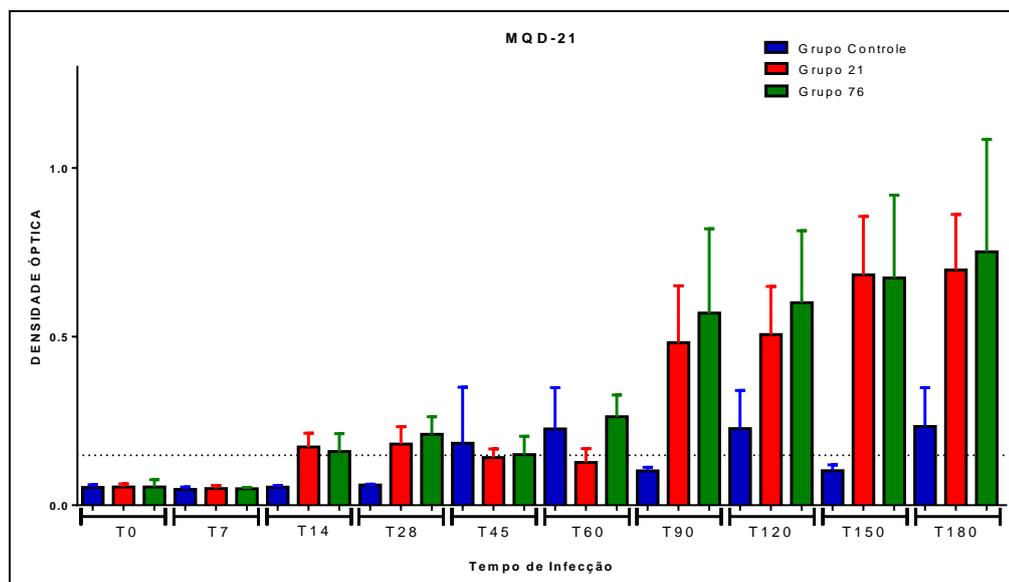


Figura 5. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade ótica (DO) 0,287. ELISA sensibilizado com o antígeno F3 76.

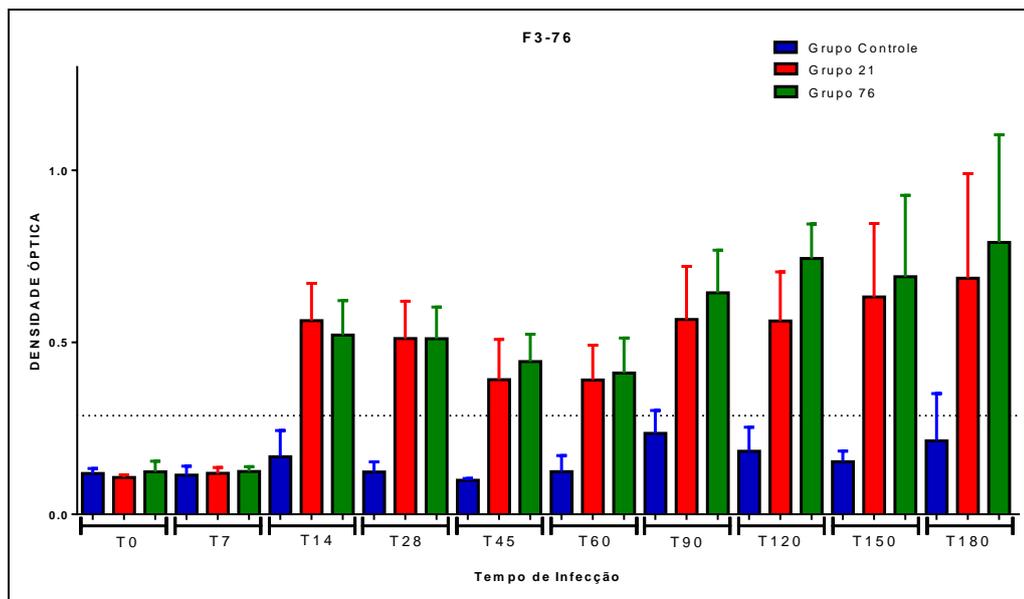
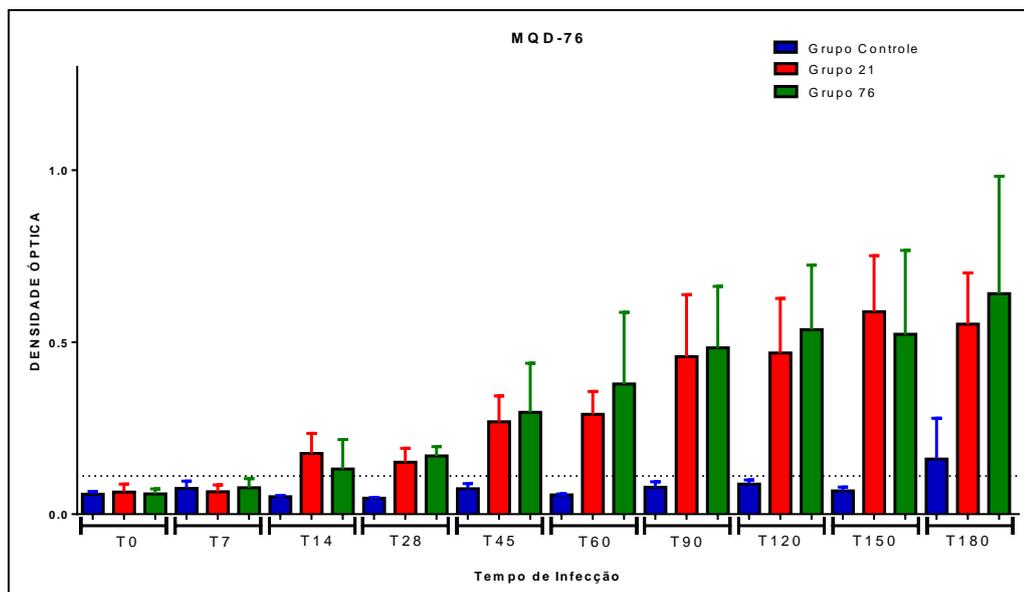


Figura 6. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A linha tracejada representa o ponto de corte de densidade ótica (DO) 0,111. ELISA sensibilizado com o antígeno MQD 76.



A realização do ELISA indireto com proteínas recombinantes (Figura 7) ainda é um estudo inicial, embora apresente percentuais de alta sensibilidade e especificidade para alguns antígenos testados. Notadamente a proteína SodC, apresentou melhores índices que o antígeno BHI, embora com o *cut-off* mais alto, esses resultados mostram que o estudo com a produção de novos antígenos é necessário para melhorar os testes diagnósticos, visando uma melhor confiabilidade nos resultados. Já que, muitos animais não apresentam sintomatologia os testes sorológicos ainda são a melhor forma de triagem da Linfadenite Caseosa, chegando a detectar uma prevalência de 43,7% no rebanho mineiro, por exemplo, (GUIMARÃES et al., 2011). Em relação às outras proteínas estudadas, também mostram um bom índice de acurácia. Santana-Jorge et al. (2016), realizaram *in silico* uma predição para detectar a proteína com melhor potencial vacinal e as proteínas SpaC, PknG e NanH apresentaram melhor potencial que a SodC. Segundo esses autores, na análise *in silico*, as proteínas SpaC, PknG e NanH, agruparam epítomos capaz de estimular uma resposta imune humoral e celular contra *C. pseudotuberculosis*. Não foi, entretanto, o que se observou neste experimento.

Para uma melhor observação, as Figuras 8, 9 e 10 apresentam a resposta à sensibilização com os antígenos BHI, F3 e MQD, para o grupo controle e para os grupos infectados com a cepa 21 e 76. No grupo controle observa-se uma resposta próxima aos resultados quando avaliados com o antígeno BHI, que nesse trabalho foi utilizado como referência. Mesmo no grupo controle os antígenos geraram respostas aos anticorpos IgG nos soros dos animais. Para Rezende et al., (2016), os imunoensaios testados atualmente têm problemas com a sensibilidade. Dessa forma o uso de novos antígenos bacterianos e proteínas recombinantes são importantes para melhorar testes sorológicos, a exemplo do ELISA.

Figura 7. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental; Grupo 21(n=6) – infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e Grupo 76 (n=4) - infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme. A letra A representa a proteína NanH, a letra B, a proteína SodC, a letra C a proteína PknG e a letra D a proteína SpaC.

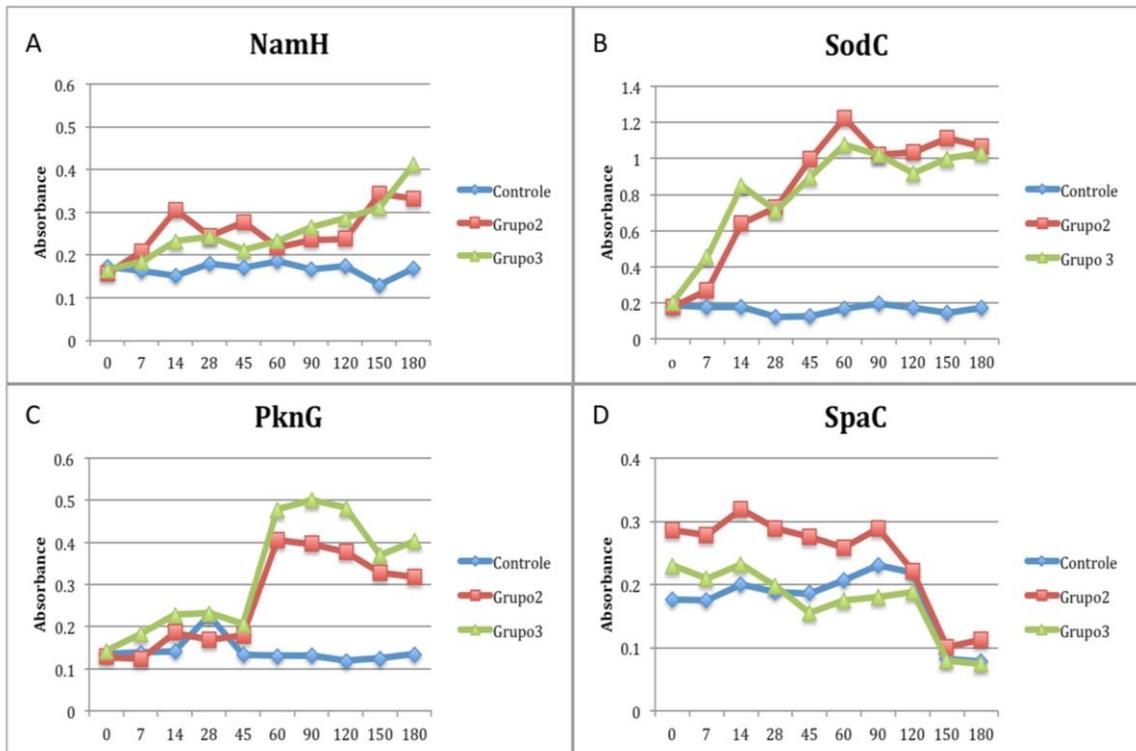


Figura 8. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo controle (n=6) – sem infecção experimental, mostrando a resposta a sensibilização de todos os antígenos (BHI, F3 21, MQD 21, F3 76 e MQD 76).

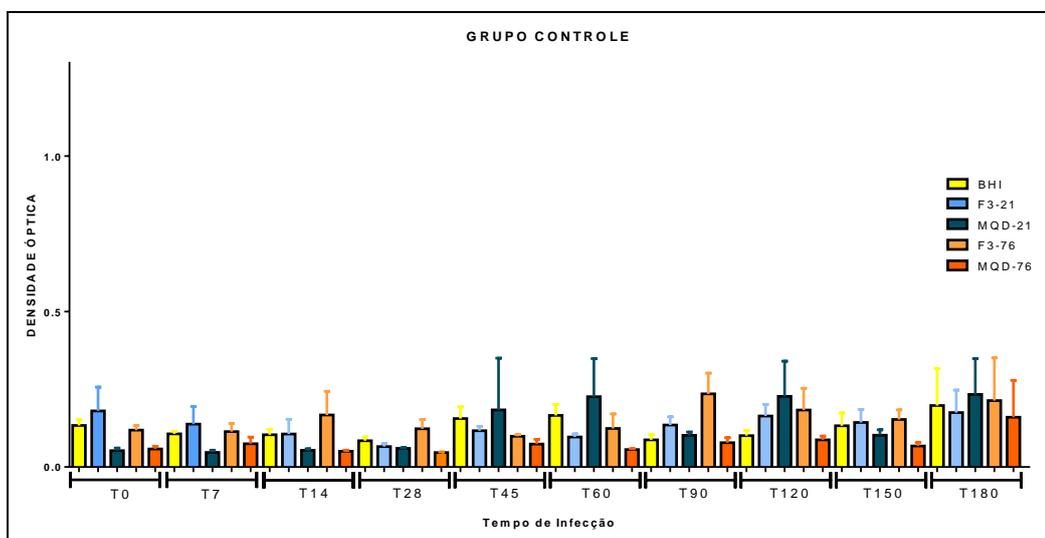


Figura 9. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo 21 (n=6), animais infectados com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme mostrando à resposta a todos os antígenos (BHI, F3 21, MQD 21, F3 76 e MQD 76).

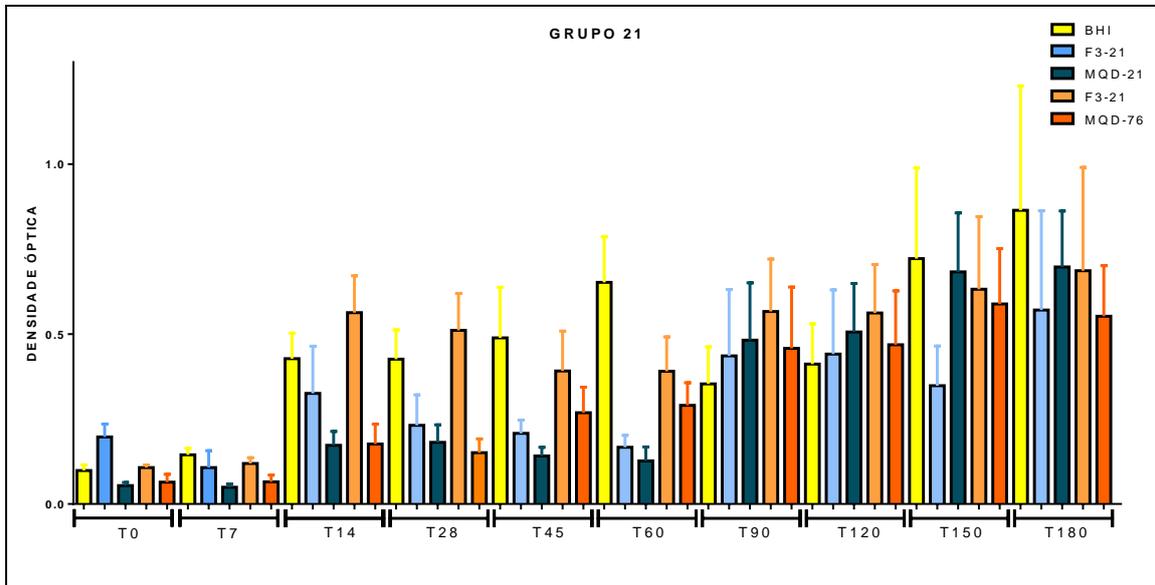
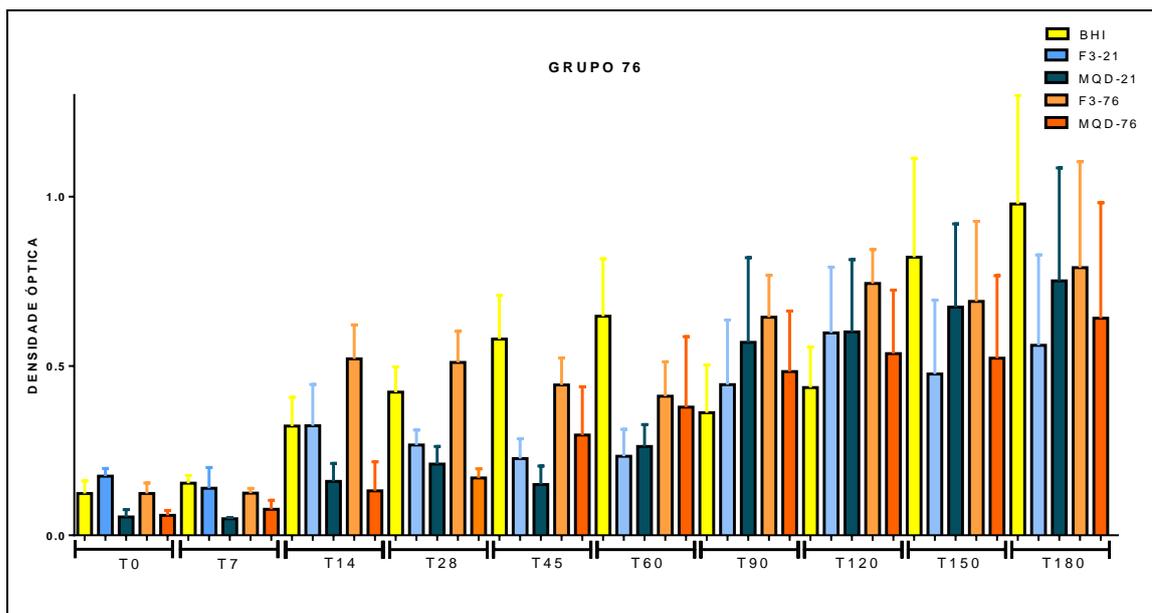


Figura 10. Cinética da produção de IgG específica anti-*C. pseudotuberculosis* em caprino ao longo de 180 dias de observação. Grupo 76 (n=4), animais infectados com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme mostrando à resposta a todos os antígenos (BHI, F3 21, MQD 21, F3 76 e MQD 21).



Para validar os testes do ELISA foram realizados testes de reconhecimento antigênico por IgG, através do *western blotting* para a fração de superfície F3 dos dois antígenos o 21 e o 76. Analisou-se o *pool* dos três grupos nos pontos de observação e o resultado pode ser verificado nas Figuras 11 e 12. Foram identificadas moléculas com peso molecular entre 6 a 115 kDa. O tempo zero de infecção não apresentou reconhecimento antigênico para os dois antígenos (F3 21 e F3 76). O perfil de bandas foram coincidentes para os dois antígenos na maioria dos tempos de experimentação. A banda mais expressiva reconhecida em todos os *pools* dos soros, aparece aproximadamente entre 64 e 70 kDa, também é reconhecida uma banda aproximada entre 30 e 37 kDa em todos os *pools* do grupo 21 e 76.

Várias bandas são reveladas nas frações F3 21 e F3 76, mas uma em especial a banda de 64 kDa está presente em todos os *pools* de forma bem expressiva. Trabalhos já realizados com *western blotting*, também evidenciaram a presença dessa banda (MOURA-COSTA et al., 2008; PAULE et al., 2003; PAULE et al., 2004). Em relação ao estudo dessas bandas, Santana-Jorge et al., (2016) avaliaram algumas proteínas da cepa *C. pseudotuberculosis* FRC41, onde observaram bandas em tamanhos próximos a esse peso molecular. A proteína NanH (Neuramidase H), está descrita com um peso molecular de 74 kDa, uma neuraminidase extracelular que pode estar envolvida com o reconhecimento do ácido siálico na superfície do hospedeiro (TROST et al., 2010).

Os resultados de Rebouças et al., (2013) estão de acordo com esse trabalho, onde destacam que o reconhecimento humoral dos antígenos por *western blotting* em soros de animais positivos para a *C. pseudotuberculosis*, é observado principalmente em moléculas com pesos moleculares de 32 e 70 kDa, sendo esta última uma banda mais expressiva. Para melhor visualizar a quantidade de bandas reconhecidas neste trabalho, a Tabela 4 apresenta resultados de *western blotting* com a fração F3 21 e, na Tabela 5, a representação do reconhecimento antigênico para a fração F3 76.

Figura 11. Membrana do *western blotting* com perfil de reatividade para Antígeno de superfície F3 21 frente ao *pool* de soros caprinos do Grupo controle (P1); Grupo 21 (P2), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; Grupo 76 (P3), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme.

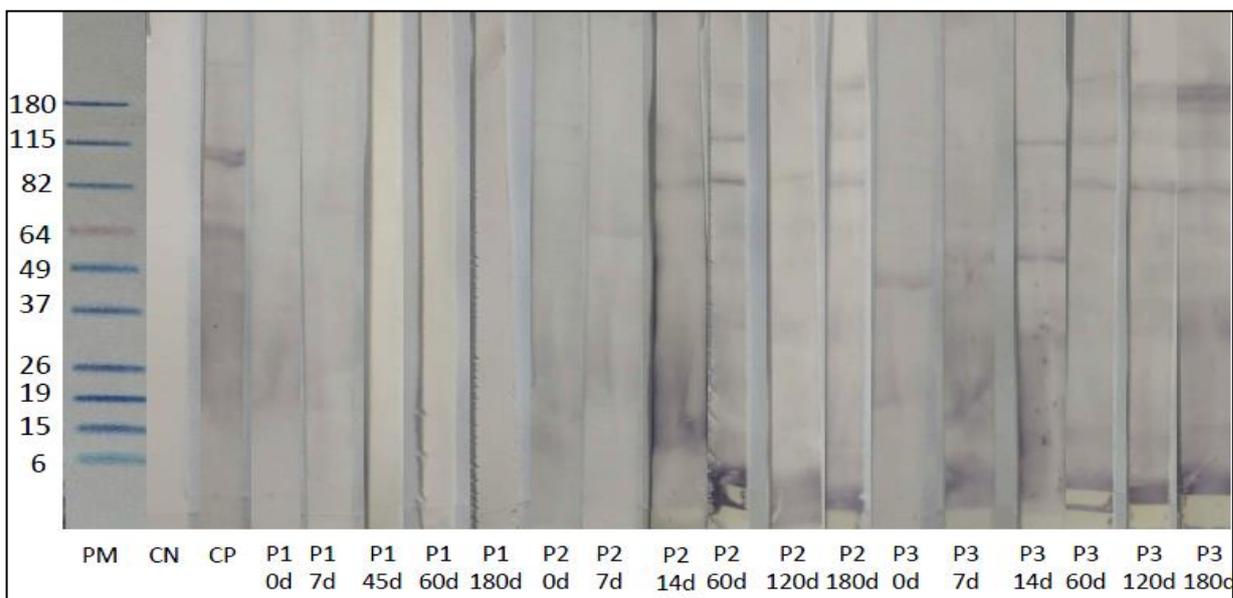


Figura 12. *Western blotting* com perfil de reatividade para o antígeno de superfície F3 76 frente ao *pool* de soros caprinos do Grupo controle (P1); Grupo 21 (P2), infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; Grupo 76 (P3), infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme.

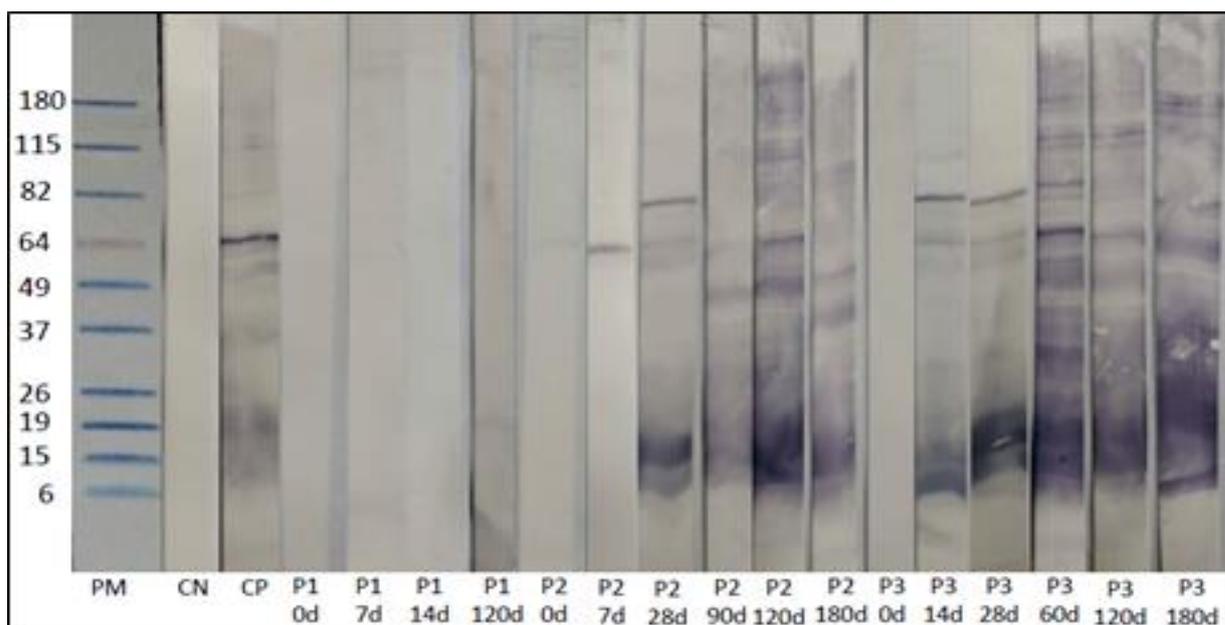


Tabela 4. Reconhecimento antigênico para a Fração F3 21, ao longo de 180 dias após inoculação nos grupos 21 e 76: Grupo 21 = (X) e Grupo 76 = (Y).

Antígenos (kDa)	Reconhecimento antigênico (dias)								
	7	14	28	45	60	90	120	150	180
115		Y	XY						
82		Y	Y	XY	XY	XY	XY	XY	XY
64	Y	XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY
49	XY	XY	XY						
37	XY	XY	XY	X	XY	XY	XY	XY	XY
26		XY	X						
19	Y		Y						
15		Y	XY	XY	Y				
6				XY	Y				

Tabela 5. Reconhecimento antigênico para a Fração F3 76, ao longo de 180 dias após inoculação nos grupos 21 e 76: Grupo 21 = (X) e Grupo 76 = (Y).

Antígenos (kDa)	Reconhecimento antigênico (dias)								
	7	14	28	45	60	90	120	150	180
115				X	Y	XY	XY	XY	XY
82	Y			XY	Y	XY	XY	XY	XY
64	X	XY	XY	XY	Y	XY	XY	XY	XY
49		XY	XY	XY	Y	XY	XY	XY	XY
37		XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY
26									
19									
15	Y	XY	XY		Y				
6					Y				

Esse resultado de reconhecimentos de banda é importante, pois a busca por novos alvos vacinais é de grande importância, visando à produção de vacinas confiáveis e em larga escala. Para que isso aconteça é necessário que vários epítomos da proteína possam induzir uma resposta imunológica tanto humoral quanto celular contra *C. pseudotuberculosis*.

Para a produção de vacinas, a depender da resposta imune efetiva contra um dado patógeno é necessário que os antígenos possuam epítomos para moléculas

MHC I e/ou MHC II, onde os epítomos através do MHC I são apresentados às células T CD8+ e aqueles apresentados por moléculas o MHC II estão envolvidos na ativação de células T CD4+, que, são do perfil de respostas Th1, leva a uma resposta imune celular, onde se destaca a produção de algumas citocinas deste perfil, especialmente de IFN- γ , que, dentre outras funções, vai ativar os macrófagos no processo da fagocitose. IFN- γ é uma citocina muito importante na regulação da resposta imune e processos inflamatórios, bem como possui importante função na defesa do hospedeiro contra infecção por patógenos intracelulares (ABBAS et al, 2015; MEYER et al., 2005).

Analisando a figura 13, observa-se que a produção *in vitro* de IFN- γ , a partir de culturas de sangue periférico caprino, indica uma tendência de maior produção nos caprinos do grupo 76, sendo estimulado pelo antígeno TPP 76. A busca por maiores informações sobre os mecanismos do reconhecimento de antígeno pelos linfócitos T é de suma importância para melhorar testes de diagnósticos. A ausência da produção do INF- γ , nos animais controles, mostra que essa citocina é produzida sob estimulação específica. Os resultados deste trabalho concordam com os resultados de Meyer et al., (2005), usando antígenos secretados.

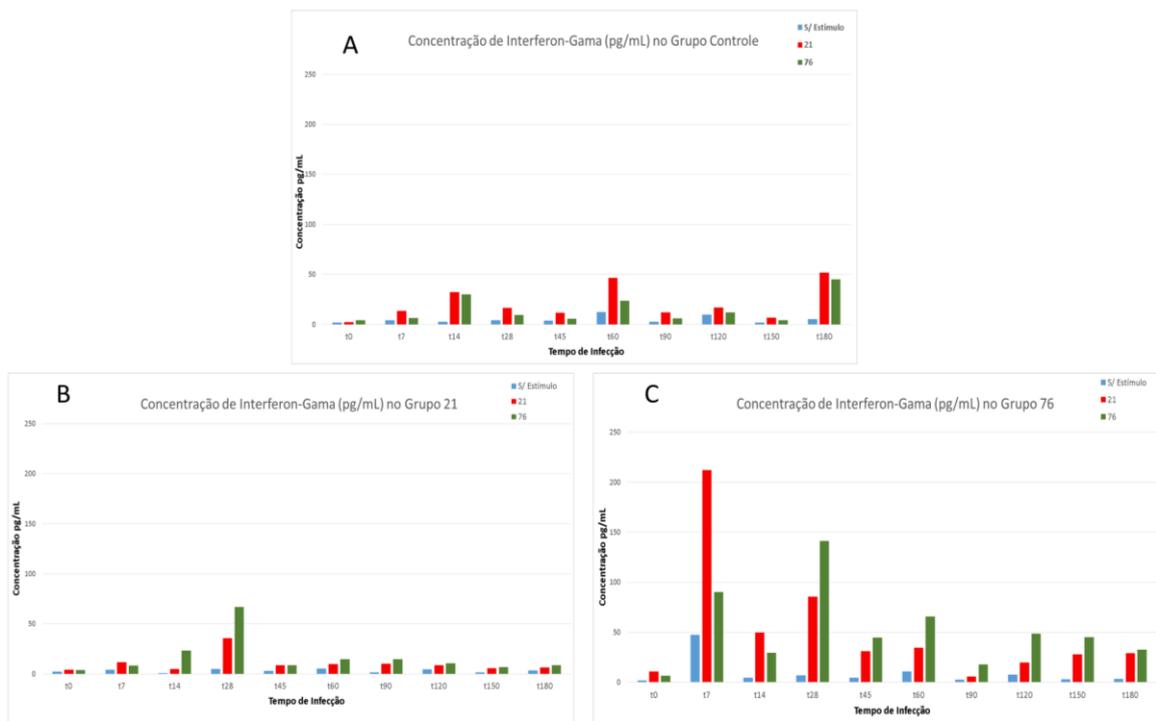
O IFN- γ está mediando um dos mais importantes mecanismos de defesa contra o *Mycobacterium tuberculosis*, aumentando os mecanismos microbicidas dos macrófagos para eliminação do patógeno (SAHIRATMSADJA et al., 2007). Assim, para se analisar a produção de IFN- γ sob estímulo dos antígenos TPP 21 e TPP 76, a Figura 13 apresenta os resultados obtidos nos três grupos.

Essa informação é de extrema importância, já que, o *C. pseudotuberculosis* é filogeneticamente semelhante ao gênero *Mycobacterium*. Pelos resultados aqui encontrados, sugere-se que a bactéria produtora de biofilme possui um mecanismo, que aumenta a produção de IFN- γ . Nesse sentido, é um grande desafio entender a complexidade das interações que o biofilme promove para proteger a bactéria no hospedeiro. Sabe-se que biofilme é um importante fator de virulência (FORESTIER et al., 2017).

No estudo da produção *in vitro* de INF- γ , o experimento analisou dez pontos de coleta e testou as amostras com um controle negativo, um controle positivo e dois estímulos antigênicos produzidos por TPP das cepas de *C. pseudotuberculosis*

produtora (76) e não produtora de biofilme (21), sendo o resultado foi analisado por teste não paramétrico de Friedman, utilizando dados separados por grupos, e pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para dados separados por estímulo dos antígenos (TPP 21 e TPP 76). Porém não houve diferença estatística significativa para nenhum destes testes realizados.

Figura 13. Produção *in vitro* de IFN- γ em cultura de sangue total de caprino do grupo Controle (n=6) (A); grupo 21 (n=6) (B); grupo 76 (n=4), sob estímulo de antígenos TPP 21- *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme e TPP 76 - *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme.



Sabe-se que os mecanismos de defesa do *Mycobacterium* são semelhantes aos mecanismos de defesa apresentados por *C. pseudotuberculosis*, assim, foi realizado um teste Teste Cervical Comparativo (TCC) com inoculação intradérmica de tuberculina PPD bovina. Para entendimento na Tabela 6 está descrito como é interpretado o teste e o resultado do TCC encontrado nos caprinos está ilustrado na Tabela 7.

Tabela 6. Interpretação do Teste Cervical Comparativo (TCC), segundo o PNCEBT (MAPA, 2006)

$\Delta B - \Delta A$ (mm)		Interpretação
$\Delta B < 2,0$	-	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	<0	Negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	0,0 a 1,9	Negativo
$\Delta B > \Delta A$	2,0 a 3,9	Inconclusivo
$\Delta B > \Delta A$	$\geq 4,0$	Positivo

O teste realizado mostra que todos os animais não apresentaram reatividade no TCC, embora tenham apresentado reatividade para o PPD de *Mycobacterium avium*, conforme o aumento do edema no local do teste. Esse fato pode ser explicado pelo contato que os animais têm com aves migratórias, ou por reações cruzadas entre estes antígenos e aqueles de *C. pseudotuberculosis*. Já em relação à *Mycobacterium tuberculosis*, possivelmente nunca houve esse contato, além de também poder sugerir a inexistência de reação cruzada entre o PPD de *Mycobacterium tuberculosis* e de *C. pseudotuberculosis*, apesar da proximidade filogenética entre ambos. Teste cutâneo realizado com antígenos desta última bactéria foi realizado e patenteado por Azevedo et al., (2016).

Tabela 7. Resultado do Teste Cervical Comparativo (TCC) em caprinos do Grupo controle; Grupo 21, infectado com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme; Grupo 76, infectado com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme.

C	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Resul.	C	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Resul.	C	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Resul.
51	0-16=-16	Neg.	60	16-20=-4	Neg.	57	8-32=-14	Neg.
52	18-42=-24	Neg.	63	12-16=-4	Neg.	59	0-21=-21	Neg.
53	35-67=-35	Neg.	69	5-33=-28	Neg.	61	17-49=-32	Neg.
54	10-12=-2	Neg.	72	0-7=-7	Neg.	65	18-52=-34	Neg.
55	5-18=-13	Neg.	75	15-69=-54	Neg.			
56	14-24=-10	Neg.	79	0-0=0	Neg.			

Legenda: C. - Caprino; Resul. - Resultado; Neg. - Negativo.

4. CONCLUSÕES

Observou-se que, com exceção do recombinante SpaC, todos os antígenos testados em imunodiagnóstico foram reconhecidos e a produção de anticorpos a partir do dia 7 pós-inoculação aumentou gradativamente se tornando uma curva mais ascendente após o 14^o dia, entretanto ficou claro que a cepa (76) forte produtora de biofilme possui uma maior capacidade de estímulo do sistema imune humoral, confirmando com o *western blotting*, onde mais bandas foram reconhecidas quando comparada a cepa (21) não produtora de biofilme. A sua capacidade de estimular macrófagos também demonstrou ser elevada em função da elevação na dosagem de Interferon-gama na fase aguda da infecção.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, 532p.
- ADHIKARI, A., RAUNIYAR, R., RAUT, P. P., MANANDHAR, K. D., Gupta, B. P. Evaluation of sensitivity and specificity of ELISA against Widal test for typhoid diagnosis in endemic population of Kathmandu. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2015.
- AZEVEDO, V. A. C., GUIMARÃES, A.S., OLIVEIRA, C. A. A., SEYFFERT, N., DORELLA, F. A., ALMEIDA, S. S., MYOSHI, A., GOUVEIA, A. M.G. **Teste de pele para diagnóstico da Linfadenite Caseosa subclínica em caprinos e ovinos** . Minas Gerais, Brasil. Patente BR PI 1102202-7 A2, 2016.
- BAIRD, G. J., FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n.4, p. 179-210, 2007.
- BAIRD, G. J., MALONE, F. E. Controlo of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA testing. **Veterinary Record**, v. 166, p. 358-362, 2010.
- BASTOS, B. L. **Resposta imune de ovinos a antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* associados a saponinas de *Quillaja saponaria* como adjuvantes e prospecção de antígenos somáticos com potencial aplicabilidade em sistemas de imunodiagnóstico**. Tese (Doutorado em imunologia), UFBA – Salvador, p. 92, 2011.

BRASIL. Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 2006. 184 p.

CARMINATI, R., BAHIA, R., DE MOURA COSTA, L. F., PAULE, B. J. A., VALE, V. L., REGIS, L., MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em vaprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003.

CLARY, G., SASINDRAN, S., NESBITT, N., MASON, L., COLE, S., AZAD, A., McCOY, K., SCHLESINGER, L. S., HALL-STOODLEY, L. *Mycobacterium abscessus* Smooth And Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes But Are Killed by Acetic Acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, AAC-01782, 2018.

FONTAINE, M. C., BAIRD, G., CONNOR, K. M., RUDGE, K., SALES, J., DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24 n. 33-34, p. 5986-5996, 2006.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1, p. 42-48, 2008.

FORESTIER, C., BILLARD, E., MILON, G., GUEIRARD, P. Unveiling and Characterizing Early Bilateral Interactions between Biofilm and the Mouse Innate Immune System. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2309. p. 1-7, 2017.

GALVÃO, I. E., FRAGOSO, S. P., OLIVEIRA, C. E., FORNER, O., PEREIRA, R. R. B., SOARES, C. O., ROSINHA, G. O. S. Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 202, 2017.

GEISSMANN, F., JUNG, S., LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v.19, n. 1, p. 71-82, 2003.

GUIMARÃES, A. S., SEYFFERT, N., BASTOS, B. L., PORTELA, R. W. D., MEYER, R., CARMO, F. B., CRUZ, J. C. M., MCCULLOCH, J. A., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1-3, p. 86-91, 2009.

GUIMARÃES, A. S., CARMO, F. B., PAULETTI, R. B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G. caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and control. **The IIOAB Journal**, v.2, n.2, p.33-43, 2011.

HOELZLE, L.E., SCHERRER, T., MUNTWYLER, J., WITTENBRINK, M. M., PHILIPP, W., HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium*

pseudotuberculosis and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 359-365, 2013.

IBTISAM, M. A. Some clinicopathological and pathological studies of *C. ovis* infection in sheep. **Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology**, v. 21, n.1, p. 327-343, 2008.

JONES, G.E., MOULD, D.L. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobin to a microtitration plate system. **Research in Veterinary Science**, v. 37, p. 87-92, 1984.

MAHMOOD, Z. K. H., JESSE, F. F., SAHAREE, A. A., JASNI, S., YUSOFF, R., WAHID, H. Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (phospholipase D): A comprehensive study in goat. **Veterinary World**, v. 8, n. 9, p.1105-1117, 2015.

MARCHIORO, S. B., SIMIONATTO, S., GALLI, V., CONCEIÇÃO, F. R., BRUM, C. B., FISCH, A., GOMES, C. K. DELLAGOSTIN, O. A. Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 1, p. 44-52, 2012.

MEYER, R., REGIS, L., VALE, V., PAULE, B., CARMINATI, R., BAHIA, R. MOURA-COSTA, L., SCHAER, R., NASCIMENTO, I., FREIRE, S. *In vitro* IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.107, n. 3, p. 249-254, 2005.

MOURA-COSTA, L. F., BAHIA, R. C., CARMINATI, R., VALE, V. L. C., PAULE, B.J.A., PORTELA, R.W., FREIRE, S.M., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., BARRETO, L. M. S., MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caprine goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 126, p. 131-141, 2008.

MOURA-COSTA, L. F., *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista Ciências Médicas Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2002.

NAKANISHI, K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 814-820, 2010.

NDOUTAMIA G., GANDA K. Determination des paramètres hématologiques et biochimiques des petits ruminants du Tchad. **Revue de Médecine Veterinaire**, v. 156, n. 4, p. 202-206, 2005.

ODHAH, M. N., ABDULLAH, F. F. J., HARON, A. W., LILA, M. A. M., ZAMRI-SAAD, M., KHUDER, Z., HAMBALI, I. U. UMAR, M., SALEH, W. M. Hemogram responses in goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic mycolic acids. **Veterinary World**, v. 10, n. 6, p. 655- 661, 2017.

OLIVEIRA, M. G., NUNES, T. L., PAIVA, A. L., BEZERRA, T. C., FERNANDES, N. S., VALE, A. M. BARRETO JUNIOR, R. A., PAULA, V. V. Aspectos hematológicos de caprinos (*Capra hircus*) da raça Canindé criados no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 0, p. 4-8, 2012.

PAULE, B. J. A., AZEVEDO, V., MOURA-COSTA, L. F., FREIRE, S. M., REGIS, L. F., VALE, V. L. C., BAHIA, R. C., CARMINATI, R., NASCIMENTO, I., MEYER, R. SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v 3, n.1, p. 44-52, 2004.

PAULE, B. J. A., AZEVEDO, V., REGIS, L. F., CARMINATI, R., BAHIA, C. R., VALE, V. L. C., MOURA-COSTA, L. F., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., GOES, A. M., MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 3, p. 129-139, 2003.

REBOUÇAS, M. F., LOUREIRO, D., BASTOS, B. L., MOURA-COSTA, L. F., HANNA, S. A., AZEVEDO, V. R. MEYER., PORTELA, R. W. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1296-1302, 2013.

REBOUÇAS, M.F., PORTELA, R.W., LIMA, D.D., LOUREIRO, D, BASTOS, B.L., MOURA-COSTA, L.F., VALE, V.L., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 213-220, 2011.

REZENDE, A. D. F. S., BRUM, A. A., REIS, C. G., ANGELO, H. R., LEAL, K. S., DE OLIVEIRA SILVA, M. T., SIMIONATTO, S., AZEVEDO, V., SANTOS, A., PORTELA, R. W., DELLAGOSTIN, O., BORSUK, S. O. *In silico* identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 521-529, 2016.

SAHIRATMADJA, E., ALISJAHBANA, B., DE BOER, T., ADNAN, I., MAYA, A., DANUSANTOSO, H., NELWAN, R. H. H., MARZUKI, S., VAN DER MEER, J. W. M., VAN CREVEL, VAN DE VOSSE, E., OTTENHOFF, T. H. M. Dynamic changes in pro-and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 820-829, 2007.

SAMPAIO, P. G. **Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *Corynebacterium pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFBA – Salvador, p. 47, 2012.

SANTANA-JORGE, K. T., SANTOS, T. M., TARTAGLIA, N. R., AGUIAR, E. L., SOUZA, R. F., MARIUTTI, R. B., EBERLE, R. J., ARNI, R. K., PORTELA R. W., AZEVEDO, V. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 83, 2016.

SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S. B., HARTWIG, D., GALLI, V., CARLESSI, R. M., MUNARI, F. M. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *E. coli* systems. **Protein Expression and purification**, v. 69, n. 2, p. 132–136, 2010.

SOUZA, C., DOS ANJOS LOPES, S. T., BATINA, P. N., CECIM, M., CUNHA, C. M., DE CARVALHO CONRADO, A., BECK, A. Estresse parasitário em cabras Saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 17-23, 2006.

TROST, E., OTT, L., SCHNEIDER, J., SCHRÖDER, J., JAENICKE, S., GOESMANN, A., HUSEMANN, P., STOYE, J., DORELLA, F. A., SOARES, S. C., D' FONSECA, V., MIYOSHI, A., RUIZ, J., SILVA, A., AZEVEDO, V., BURKOVSKI, A., GUIISO, N., JOIN-LAMBERT, O. F., KAYAL, S., TAUCH, A. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. **BMC Genomics**, v.11, n. 1, p.728-745, 2010.

VALE, V., FREIRE, S., RIBEIRO, M., REGIS, L., BAHIA, R., CARMINATI, R., PAULE, B. J. A., NASCIMENTO, I., MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n.2, p. 192-200, 2003.

WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.17, n.2, p. 359-371, 2001.

8. CAPÍTULO V

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS GTPASES RAB 5 E RAB 7 A PARTIR DE
MACRÓFAGOS INFECTADOS COM CEPAS DE *Corynebacterium*
pseudotuberculosis PRODUTORA E NÃO PRODUTORA DE BIOFILME**

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é um patógeno intracelular facultativo que utiliza alguns mecanismos para sobreviver dentro dos macrófagos. Durante o processo da fagocitose, essa sobrevivência pode ser atribuída à capacidade de inibir a fusão do fagossomo ao lisossomo ou a inibição da ação de enzimas lisossomais. Nessa fusão, algumas proteínas, incluindo as Ras GTPases estão envolvidas no processo de maturação e são responsáveis por regular o tráfego de vesículas de membranas. Assim, para melhor entender os mecanismos do fagossomo no processo de escape nesse patógeno, avaliou-se a capacidade de linhagens de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme atuarem na modulação da expressão das proteínas endossomais GTPases Rab 5 e Rab 7, no estudo de infecção de macrófagos caprinos *in vitro*. Portanto foi coletado sangue de dez caprinos da raça Canindé, infectados com cepas de *C. pseudotuberculosis* produtor e não produtor de biofilme. Foi aplicada polivinilpirrolidona em amostras de sangue para a separação de células mononucleares do sangue periférico. Essas células foram incubadas em placas contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e mantidas a 37 °C, com 5% de Co₂. Após 16 dias do cultivo essas células foram infectadas com as mencionadas cepas. A suspensão bacteriana foi centrifugada e o *pellet* foi marcado com anticorpos Rab 5 e Rab 7. Para avaliar a expressão dessas proteínas foi realizada leitura por citometria de fluxo. Observou-se que cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme podem alterar a expressão de proteínas Rab em macrófagos cultivados *in vitro*, bem como a diminuição da expressão das proteínas Rab 5 e 7 pela cepa produtora de biofilme e da Rab 7 pela cepa não produtora de biofilme, indica que diferentes mecanismos são utilizados entre cepas e que a mais virulenta modula as proteínas Rabs de forma mais acentuada.

Palavras-chave: Biofilme, citometria de fluxo, GTPases, macrófagos, proteína Rab 5 e Rab 7.

1. INTRODUÇÃO

A fagocitose de patógenos por macrófagos é um importante processo da resposta imune inata. Patógenos são envolvidos por membranas fagocíticas para formar fagossomos imediatamente após a internalização. Os fagossomos são então processados por uma série de interações, resultando nas suas maturações. Durante esta maturação ocorre a fusão com o lisossomo em um processo conhecido como biogênese do fagolisossomo, o qual adquire propriedades degradativas e microbidas (VIEIRA, 2002). Várias proteínas, incluindo as Rab GTPases estão envolvidas neste processo de maturação e são responsáveis por regular o tráfego de vesículas de membranas. (HUTAGALUNG; NOVICK, 2011). Esse tráfego de vesículas é um processo que transporta proteínas e outras moléculas através de células, mantendo uma organização celular e uma identidade compartimental (ORY; GASMAN, 2011). Nesse processo de regulação, as proteínas Rabs geralmente circulam entre os fatores ativos vinculados ao GTP e estão envolvidas no controle da fagocitose. Assim, Rab 5 e Rab 7 são enriquecidas em endossomos iniciais e tardios, respectivamente, no processo de maturação do fagossomo (SZATMARI; SASS, 2014).

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente causador da Linfadenite Caseosa (LC), uma doença crônica responsável por perdas econômicas significativas na criação de ovinos e caprinos em todo o mundo. Ao penetrar no hospedeiro, *C. pseudotuberculosis* é capturado localmente por células fagocitárias, neutrófilos e macrófagos. Após a fagocitose, o fagossomo se funde ao lisossomo, contudo a bactéria continua a se multiplicar dentro dos fagolisossomos, levando à degeneração e morte celular dos macrófagos (BOGDAN et al., 1997; HARD, 1975). A incapacidade por parte dos macrófagos de eliminar a bactéria pode ser devido a vários mecanismos de sobrevivência e à utilização de várias estratégias para se adaptar ao ambiente. Uma destas estratégias pode estar relacionada com a formação de biofilme, o qual confere resistência ao patógeno e está envolvido em diversos tipos de doenças, como mastite, pneumonia, bem como na LC. Essas infecções envolvem um modo de crescimento dos biofilmes, geralmente crônicos e de difícil tratamento (COSTERTON et al., 1995; MAH; O'TOOLE, 2001; OLSON et al., 2002).

Estudos de biofilmes revelaram grupos diferenciados e estruturados de agregados celulares. A formação de biofilme em bactérias pode evitar a fagocitose por células fagocitárias, podendo ser responsáveis por granulomas nessas infecções (COSTERTON et al., 1999).

Buscando entender melhor quais os mecanismos que o *C. pseudotuberculosis* emprega para resistir no processo de fagocitose e observando que as GTPases Rab 5 e 7 têm importância fundamental na maturação do fagossomo e no processo de escape do micro-organismo, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de linhagens de *C. pseudotuberculosis* produtora e não produtora de biofilme atuarem na modulação da expressão das proteínas endossomais GTPases Rab 5 e Rab 7, em um estudo de infecção de macrófagos caprinos *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Comissão de Ética no Uso de Animais

Esse experimento foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA- ICS) sob o número 123/2017.

2.2. Grupos experimentais e coleta de amostra

Dez caprinos da raça canindé foram utilizados neste experimento. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: i) 4 animais pertencentes ao grupo controle (animais 51, 52, 54 e 55); ii) 3 animais infectados com *C. pseudotuberculosis* não produtor de biofilme “Cap3W (21)” (animais 69, 75 e 79); iii) 3 animais infectados com *C. pseudotuberculosis* produtor de biofilme “CapJ4(76)” (animais 57,59 e 61). Amostras de 22 mL de sangue venoso foram coletadas de cada animal por venopunção da jugular, coletadas em tubos a vácuo contendo solução de heparina como anticoagulante. As coletas foram realizadas antes da infecção (tempo zero) e 180 dias após a infecção.

2.3. Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e diferenciação dos macrófagos

Amostras contendo 6,7 mL de sangue foram diluídas em 13,3 mL de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4 a 37 °C, as quais foram aplicadas em 11 mL de gradiente de densidade de sílica coloidal revestida por polivinilpirrolidona (Percoll, GE healthcare), com densidade igual a 1,0, acrescidas de 2 mL de cloreto de sódio (NaCl) 1,5 M e 7 mL de água deionizada estéril. As amostras foram centrifugadas por 50 minutos a 2.500 rotações por minuto (rpm) com 20 segundos de aceleração de 60 segundos de frenagem a 4 °C. Depois de centrifugadas o anel contendo PBMCs foi coletado e lavado três vezes com 10 mL de PBS e centrifugando a 6.000 rpm por 20 minutos, nas mesmas condições de temperatura, aceleração e frenagem descritas anteriormente. As células resultantes foram contadas em hematocítômetro e, ajustadas para uma suspensão com volume total de 2 mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina). Essa suspensão foi inoculada em triplicata em placas de 24 cavidades, mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. Após 14 horas de incubação foram realizadas sucessivas leituras em microscópio invertido para avaliar a aderência das células na placa, bem como as trocas do meio de cultura, incubando-se as placas até o 5º dia, quando foi lavado por 3 vezes com PBS. A partir deste dia, as culturas foram observadas em microscópio invertido a cada 48 horas para verificar a viabilidade celular até sua diferenciação em macrófagos no 16º dia de incubação (MORATO et al., 2014).

2.4. Cultivo bacteriano dos isolados e contagem de células para infecção dos macrófagos

As amostras foram cultivadas em 200 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion), por 48 horas em estufa a 37 °C. Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 6.000 rpm, desprezando o sobrenadante e acrescentando 10 mL de solução salina estéril para ressuspender todo o *pellet*. Em seguida foi retirado 1 mL da cultura bacteriana, lavado duas vezes com solução salina, centrifugando por 5 minutos a 5.000 rpm. Depois de desprezado o sobrenadante, *Sybr Safe* (Life

Technologies) diluído 1:20 foi adicionado e incubado por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Uma nova lavagem foi realizada para remoção do reagente e a amostra foi ressuspensa com 1 mL de solução salina. Em seguida, 50 µL da suspensão bacteriana foram retirados e acrescidos a 450 µL de solução salina, em tubos com *Beads trucount* (*BD Biosciences*) para realizar a contagem do inóculo por mensuração em citometria de fluxo. O estabelecimento da concentração bacteriana seguiu o seguinte cálculo: bactérias totais = (nº eventos bactérias/ nº eventos *beads*) x nº de *beads* por µL (constante no lote), (SAMPAIO, 2012).

2.5. Infecção de macrófagos

Após a diferenciação dos PBMCs em macrófagos, estes foram infectados com os preparados das cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme na proporção 1:1 (1 bactéria para/1 macrófago). Para a infecção, foi retirado o sobrenadante de cada poço da placa de cultura, acrescentando 1 mL de bactéria diluída e incubado por 3 horas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂. Um poço com macrófagos isolados de cada animal foi infectado com cada um dos seguintes tratamentos: i) bactéria não produtora de biofilme (21); ii) bactéria produtora de biofilme (76); iii) meio de cultura como controle em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) sem antibiótico. Após esse período o sobrenadante de todos os tratamentos foi coletado e uma lavagem com PBS foi realizada. Após essa lavagem foi iniciado os procedimentos para a marcação com os anticorpos para análise da expressão das GTPases Rab 5 e 7.

2.6. Análise da Expressão das GTPases Rab 5 e Rab 7

Para avaliar a expressão de Rab 5 e Rab 7 em macrófagos não infectados e infectados com as cepas de *C. pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme, foi realizado a remoção dos macrófagos, através da adição de 200 µL de tripsina após retirada do sobrenadante da cultura e lavagem dos poços com PBS. Em seguida aos macrófagos com tripsina foram incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37 °C por 3 minutos. Após leve batida na placa de cultura foram adicionados 800 µL de PBS e as células foram coletadas e transferidas para tubos de ensaio. Foi

realizada a centrifugação por 3 minutos a 3.250 rpm e posteriormente descarte do sobrenadante. Após ressuspender as células em 100 μ L de PBS foi realizado o bloqueio do receptor Fc através da adição de 1 μ L de bloqueador do receptor CD 8^a na concentração de 0,5 mg/mL por 30 minutos. Depois de lavadas com PBS suplementado com 1% BSA, as células foram fixadas e permeabilizadas de acordo com as instruções do fabricante do *Kit Fix, Perm – Cell Permeabilization (Life Technologies)*. Depois 0,5 μ L do anticorpo primário Rab 5 (*SIGMA*) na concentração de 2 mg/mL em um tubo e no outro tubo utilizado 0,3 μ L do anticorpo primário Rab 7 (*SIGMA*) na concentração de 2 mg/mL foram adicionados. Na sequência, as células foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos no gelo e no escuro. Após lavagem com PBS 5% SFB foi centrifugado por 3 minutos a 2.500 rpm, em seguida o sobrenadante foi desprezado e adicionados 0,3 μ L com anticorpo secundário *ALEXA FLUOR 488 (SIGMA)* na concentração de 2 mg/mL e incubado no gelo por 20 minutos no escuro. Após essa etapa foi realizada lavagem com PBS-BSA 1% e ressuspensas em 300 μ L de PBS para a análise por citometria de fluxo. Para o ensaio de citometria de fluxo foi realizado a mensuração no citômetro de fluxo (*FACScalibur –BD*), utilizando o *software Cell Quest Pro v. 5.2.1*. O nível de Rab 5 e 7 nas células foi determinado como média geométrica da intensidade de fluorescência (*MIF*) das amostras marcadas com Rab 5 e 7. Para controle do experimento de células foram incubadas sem a presença do anticorpo primário ou sem a presença do anticorpo primário e secundário.

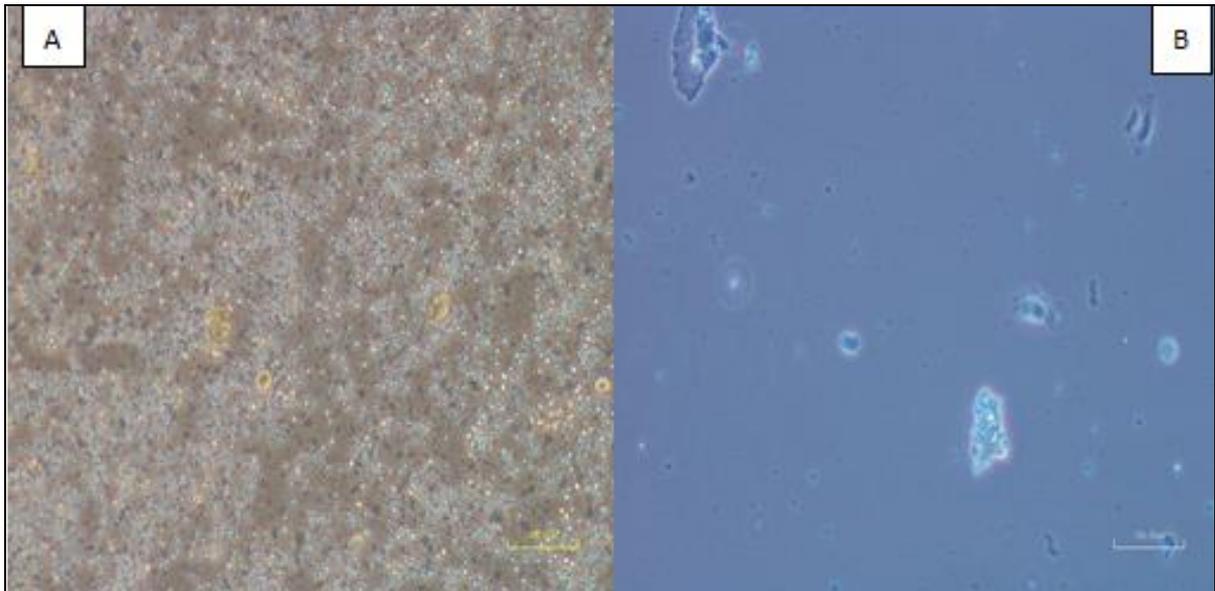
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento foi utilizada uma placa de seis poços para a cultura no tempo zero, na qual foi incubado sangue periférico de dois animais, porém no decorrer do cultivo ao longo de dezesseis dias, uma amostra de células morreu, ficando apenas a amostra do animal 54. No cultivo da coleta no tempo 180 dias de experimento, houve pouca diferenciação de células, visto que normalmente em experimento com camundongos utiliza-se o plaqueamento com 1×10^6 de células, nesse trabalho só foi possível incubar com 2×10^5 de células mononucleares. É provável que essa condição tenha desencadeado pouca viabilidade de diferenciação em macrófagos, sendo que no cultivo de 180 dias as amostras dos animais nº 51 e 61 tiveram morte

celular. A amostra do animal 75 foi utilizada para calibração do citômetro, bem como para os testes sem marcação de anticorpos.

Na Figura 1A e 1B, pode-se observar o cultivo dessas células em dois tempos diferentes, na figura 1A, a incubação tem 14 horas e na figura 1B tem-se o cultivo de cinco dias, na qual se pode verificar a diferenciação de células. Também é possível constatar que ao longo do tempo de incubação houve morte celular, embora a condição de cultivo tenha sido a mais uniforme possível. Essa morte celular dificultou a viabilidade de experimentos com células monucleares do sangue periférico em caprinos, implicando em ensaios ainda incipientes de marcação das proteínas GTPases Rab em células sanguíneas de caprinos infectados com *C. pseudotuberculosis*.

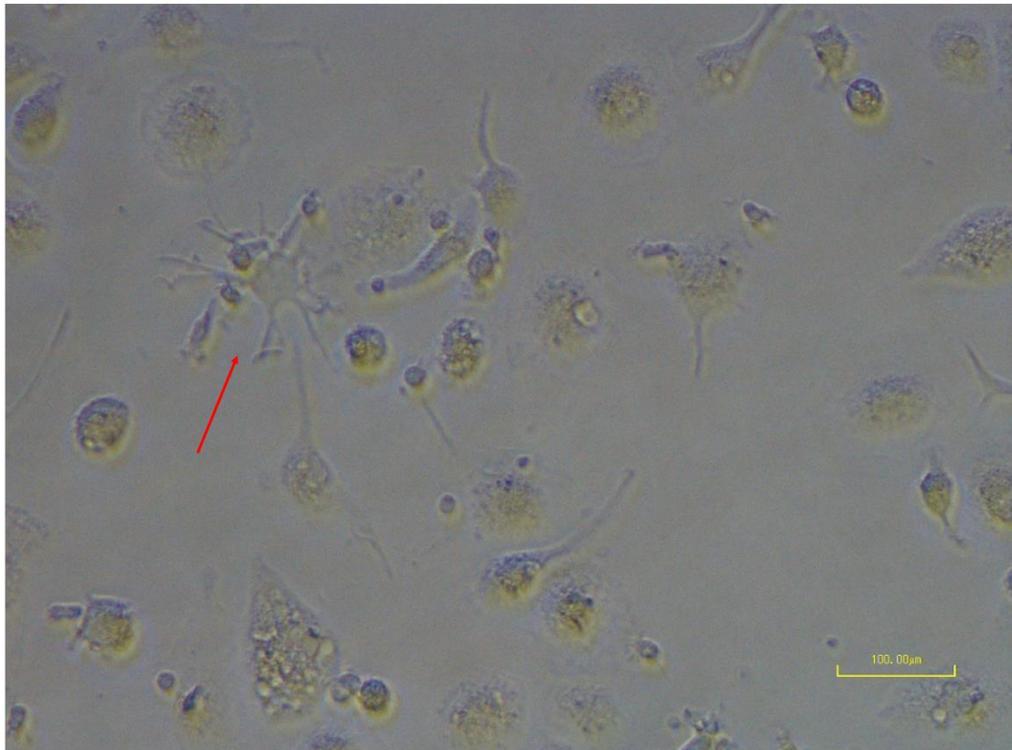
Figura 1. Imagem em microscópio invertido e de fluorescência (Nikon Eclipse), onde na figura 1A mostra o cultivo de PBMC no período de 14 horas e na figura 1B, o cultivo estabelecido em 5 dias.



Na Figura 2, observa-se macrófagos em diferenciação, o que mostra que embora o cultivo resultasse num menor número de células do que o esperado, não houve contaminações. Esse fato foi essencial para a infecção por *C. pseudotuberculosis* e posterior marcação com as proteínas Rab 5 e 7 para verificar sua expressão em macrófagos infectados.

Como *C. pseudotuberculosis* é uma bactéria intracelular é importante compreender o trânsito de vesículas do fagossomo, onde esse tráfico é um processo altamente regulado, mantendo a organização celular e a identidade de cada organela (ORY; GASMAN, 2011), também compreender como funcionam as expressões de rabs, principalmente em células de animais já infectados com o micro-organismo é relevante como contribuição para se entender a patogênese da doença.

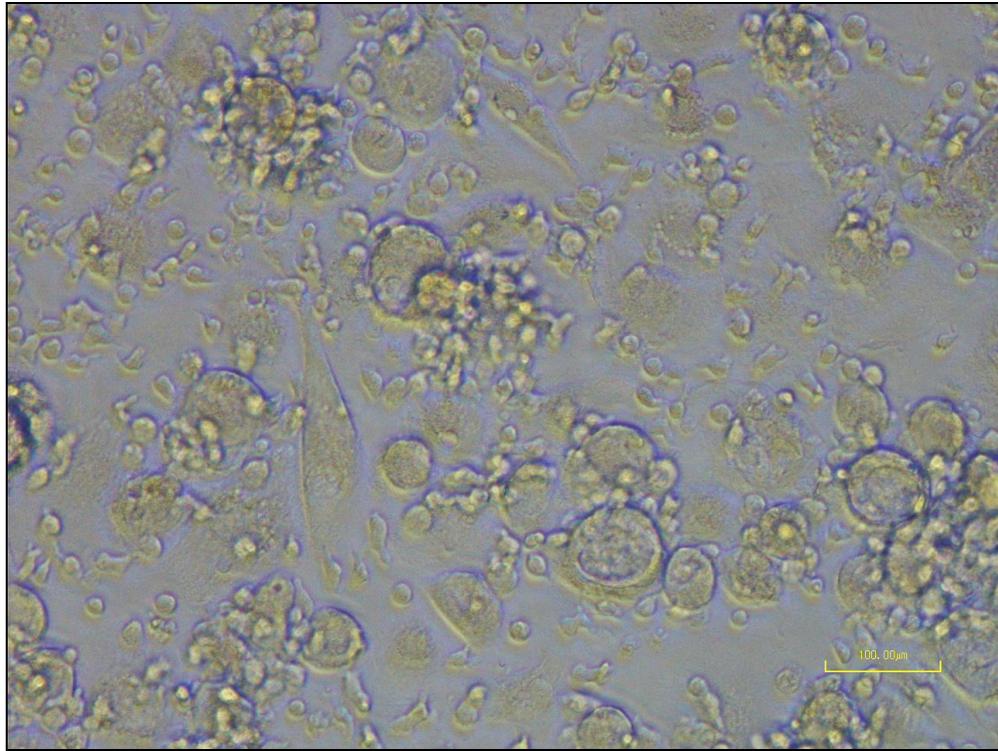
Figura 2. Imagem em microscópio invertido e de fluorescência (Nikon Eclipse), demonstrando macrófagos diferenciados.



Para saber qual o dia mais provável para a infecção dos macrófagos, houve um acompanhamento do crescimento celular, na Figura 3 os macrófagos já estavam estabelecidos, o que motivou a infecção dos mesmos com 16 dias de cultivo.

Assim, como mencionado, os macrófagos foram infectados com dezesseis dias de cultivo. Dessa forma, definiu-se que cada poço seria usado para um tipo de marcação (para a Rab 5 ou para a Rab 7).

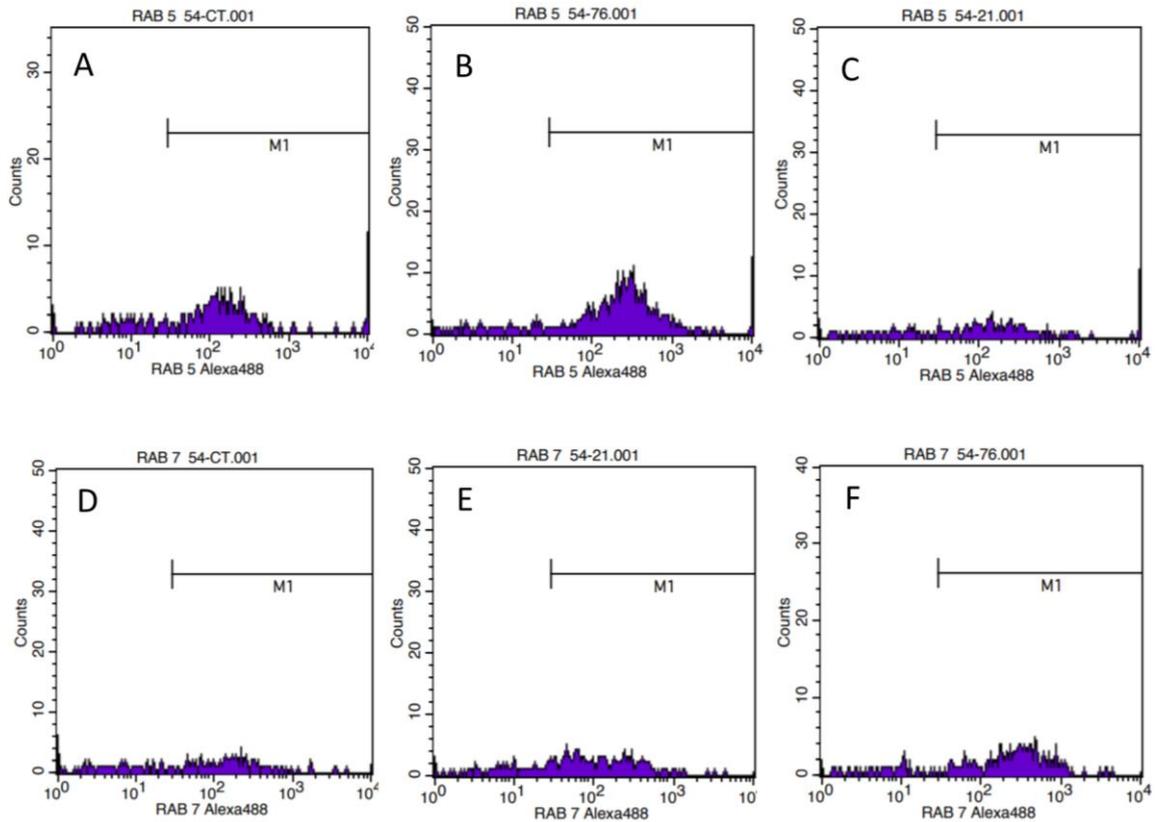
Figura 3. Imagem em microscópio invertido e de fluorescência (Nikon Eclipse), mostrando cultivo de macrófagos com 15 dias de cultivo.



No tempo zero (controle) e após três horas de infecção com as cepas produtoras e não produtoras de biofilme, observou-se a expressão da Rab 5 (Figura 4 A, B e C) e Rab 7 (Figura 4 D, E e F). Pode-se constatar que os macrófagos infectados têm uma maior intensidade de fluorescência de Rab 5 do que de Rab 7, notando-se também que os macrófagos infectados pela cepa 21 apresentam menor fluorescência que os macrófagos infectados pela cepa 76, enquanto a cepa 76 tem maior expressão para Rab 7 que a cepa 21. O fato pode estar associado ao amadurecimento do fagossomo e a regulação por Rab 5 no início do processo e o Rab 7 no processo tardio (ARMENTIA et al., 2016). Então a Rab 7 pode expressar mais na presença da cepa produtora de biofilme, enquanto a Rab 5 apresentou uma menor expressão na presença da cepa não produtora de biofilme. Esse mecanismo, onde a cepa mais resistente apresentou menor expressão que a cepa mais atenuada na Rab 5, pode estar relacionada com algum processo de proteção do biofilme em escapar da expressão da Rab 5 e apenas ser detectado mais tardiamente no Rab 7. Patógenos intracelulares exploram o sistema Rab para evadir das defesas do hospedeiro. Esse mecanismo já foi demonstrado, em estudos com

Mycobacterium tuberculosis, no qual o micro-organismo bloqueia as progressões do fagossomo na conversão de Rab 5-Rab 7 (FRATTI et al., 2001).

Figura 4. Intensidade de Fluorescência de Rab 5 e Rab 7 em macrófagos não infectados e após 3 horas de infecção com a linhagem 21 e a linhagem 76 de *C. pseudotuberculosis* quantificada por citometria de fluxo (1 caprino).

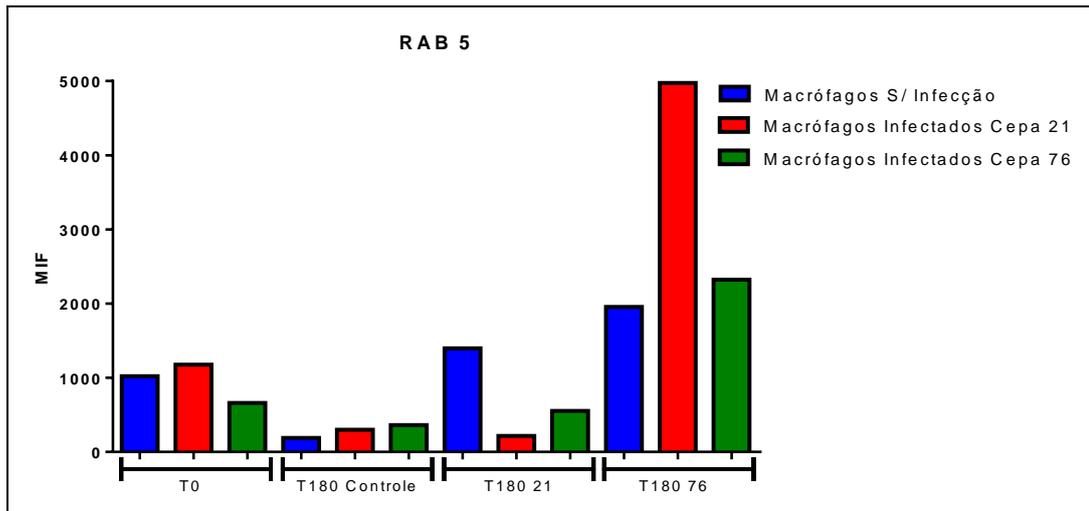


Legenda: A- Expressão de Rab 5 no controle; B- Expressão de Rab 5 após 3 horas de infecção com a linhagem 76; C- Expressão de Rab após 3 horas de infecção com a linhagem 21; D- Expressão de Rab 7 no controle; E- Expressão de Rab 7 após 3 horas de infecção com a linhagem 21; F- Expressão de Rab após 3 horas de infecção com a linhagem 76;

Na Figura 5, apresenta-se uma comparação entre a expressão de Rab 5 em macrófagos infectados com as cepas 21 e 76, observa-se que os macrófagos infectados pela cepa 76 apresentaram uma menor intensidade de fluorescência em relação a cepa 21 no animal infectado com a cepa 76, acontecendo o contrário quando a infecção é pela cepa 21. Existe um sinergismo na infecção do macrófago com a cepa 21 com a coinfeção do animal infectado pela cepa 76 que estimula a expressão da Rab 5. Em seu estado ativo as proteínas Rab 5 recrutam vários mecanismos efetores para a membrana, a qual estão ligadas (SZATMARI; SASS,

2014). Esse fato pode ter aumentado à expressão nos macrófagos do animal já infectado.

Figura 5. Gráfico com intensidade de fluorescência de Rab5 em macrófagos não infectados e após 3 horas de infecção com a linhagem 21 e a linhagem 76 de *C. pseudotuberculosis* quantificada por citometria de fluxo nos tempos zero e com 180 dias de infecção com essas mesmas linhagens.



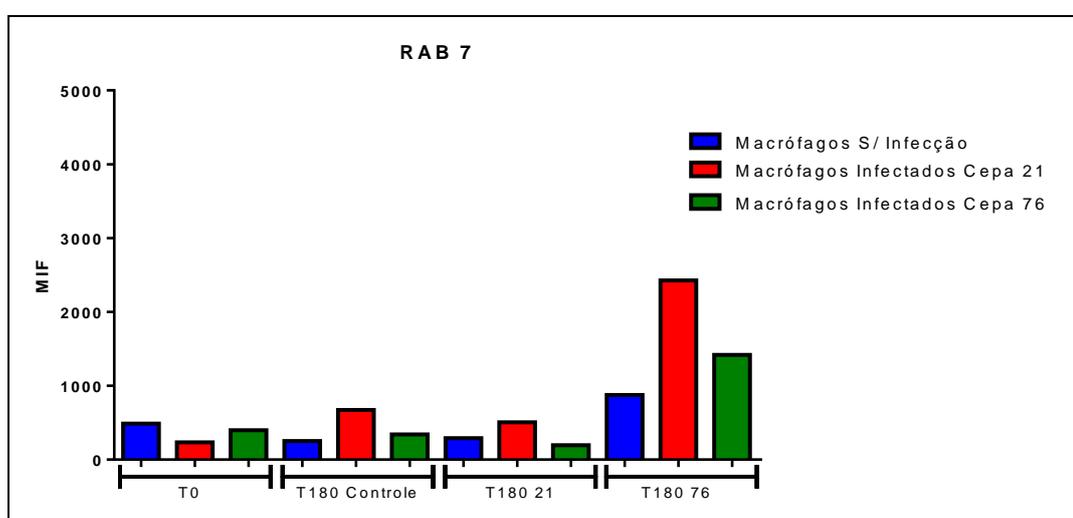
Observa-se que o *C. pseudotuberculosis* da cepa 21 modula a maturação do fagossomo desde o início da maturação na regulação de Rab 5 do processo precoce ao tardio, quando envolve a diminuição da expressão da Rab 7, na qual a bactéria pode escapar da resposta imune inata, alterando a resposta adaptativa, permanecendo no fagossomo. Sabe-se que os patógenos bacterianos intracelulares evoluíram múltiplos mecanismos para modular ou antagonizar as diversas funções das GTPases Rab (FRATTI et al., 2001).

Já em relação à comparação entre a expressão de Rab 7 mostrada na Figura 6, os macrófagos infectados com as cepas 21 e 76, pode-se verificar que os macrófagos infectados pela cepa 76 apresentaram uma menor intensidade de fluorescência em relação às duas cepas infectadas nos animais.

Ao analisar os dois gráficos da expressão de Rab 5 e Rab 7, é visível que os macrófagos infectados com a cepa 21 têm um favorecimento na expressão nos animais já infectados com a cepa 76, já nos animais infectados com a cepa 21 têm um resultado da expressão de Rab 7 próximo ao controle, observa-se que nesse

caso pode ter uma inibição na fagocitose, ou os animais infectados com a cepa 76, por ser uma cepa mais virulenta, tenha estimulado um maior trânsito de vesículas do fagolisossomo e conseqüente maior expressão de Rab 7 em macrófagos infectados com a cepa 21.

Figura 6. Gráfico com intensidade de fluorescência de Rab 7 em macrófagos não infectados e após 3 horas de infecção com a linhagem 21 e a linhagem 76 de *C. pseudotuberculosis* quantificada por citometria de fluxo nos tempo zero e com 180 dias de infecção com essas mesmas linhagens.



A Rab 7 aparece na membrana do fagossomo depois de Rab 5, sendo a proteína lisossomal de interação com a Rab 7 (RILP) responsável em mediar a fusão dos endossomas tardios com os lisossomos, bem como a formação do fagolisossomo, esse mecanismo de internalização pode ser manipulado por patógenos intracelulares facultativos, evitando o recrutamento de RILP por Rab 7 para facilitar o crescimento do compartimento ligado à membrana na qual a bactéria pode replicar (JORDENS et al., 2001). Sun et al. (2007) relataram que a *Mycobacterium tuberculosis* não inibe necessariamente o recrutamento de Rab 7 nos vacúolos, mas, que parece inibir a função deste, ou seja quando os macrófagos estão infectados por esse micro-organismo, acontece uma inibição do recrutamento de RILP.

Outros micro-organismos já foram estudados nessa dinâmica, a exemplo de *Helicobacter pylori* que aproveita essa interação e cria um compartimento vacuolar

para o alojamento bacteriano (JOHANSSON et al., 2007). Bactérias intracelulares são englobadas por macrófagos em fagossomos e transportadas para os fagolisossomos, para serem destruídas, porém, alguns patógenos desenvolvem algumas estratégias e interferem na biogênese dos fagolisossomos, permitindo que estes possam replicar dentro de suas células hospedeiras, “enganando” o sistema imune (FLANNAGAN et al., 2009).

Em relação à expressão de Rab5 e Rab7, observa-se que a Rab5 apresenta maior expressão que a Rab 7 no animal infectado com a cepa não produtora de biofilme (21). Esse processo de modulação das Rabs envolve a transformação do fagossomo em fagolisossomos, na qual essas Rabs precisam regular os eventos de fusão, permitindo a conversão por Rab5 de forma mais precoce e envolvendo tardiamente a Rab7, essa progressão requer uma fase transitória entre Rab5 e Rab7, que coexistem na mesma membrana. Essa informação sugere que os fagossomos contendo micro-organismos não conseguem se fundir com os endossomos tardios, porém interagem com os endossomos precoces (POTERYAEV et al., 2010).

Analisando os resultados aqui expostos, observa-se uma maior expressão de Rab 5 em relação a Rab 7, no entanto, a expressão de Rab 5 e 7 é maior nos fagossomos infectados pela cepa 21, principalmente quando comparada aos animais infectados com a cepa 76. Esses resultados podem sugerir que as duas cepas estudadas sobrevivem em compartimentos diferentes na internalização do macrófago e principalmente que as diferentes moléculas produzidas por essas cepas 21 e 76 de *C. pseudotuberculosis*, podem afetar de forma oposta o tráfego dos endossomos e a junção do fagossomo e lisossomo. Souza et al, (2014), obteve resultados concordantes com os aqui apresentados, quando avaliou a expressão das mesmas Rabs em macrófagos murinos. Foi por eles observado que a cepa virulenta VD57 induziu menor expressão da Rab 5 e Rab 7 em relação a cepa T1, que é atenuada.

4. CONCLUSÕES

Cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* produtoras e não produtoras de biofilme podem alterar a expressão de proteínas Rab em macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico, cultivados *in vitro*;

A diminuição da expressão das proteínas Rab 5 e 7 pela cepa produtora de biofilme (76), indica que diferentes mecanismos são utilizados entre as cepas e que a mais virulenta modula as proteínas Rabs de forma mais acentuada.

Porém outros trabalhos serão necessários para melhor entender modulação de *C. pseudotuberculosis* nas proteínas Rab 5 e Rab 7.

5. REFERÊNCIAS

- ARMENTIA, M. M. L., AMAYA, C., COLOMBO, M. I., Rab GTPases and the autophagy pathway: bacterial targets for a suitable biogenesis and trafficking of their own vacuoles. **Cells**, v. 5, n. 1, p. 11, 2016.
- BOGDAN, J. R., NEWLANDS-MONTEITH, C. F., ELLIS, J. A. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 299-310, 1997.
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., GREEBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n.21, p. 318-322, 1999.
- FLANNAGAN, R.S., COSÍO, G., GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 355, 2009.
- FRATTI, R. A., BACKER, J. M., GRUENBERG, J., CORVERA, S., DERETIC, V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 3, p. 631-644, 2001.
- HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 6, p. 1439-1449, 1975.
- HUTAGALUNG, A. H., NOVICK, P.J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 119-149, 2011.

JOHANSSON, M., ROCHA, N., ZWART, W., JORDENS, I., JANSSEN, L., KUIJL, C., OLKKONEN, V. M., NEEFJES, J. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7–RILP–p150^{Glued}, ORP1L, and the receptor β III spectrin. **Journal Of Cell Biology**, v. 176, n. 4, p. 459-471, 2007.

JORDENS, I., FERNANDEZ-BORJA, M., MARSMAN, M., DUSSELJEE, S., JANSSEN, L., CALAFAT, J., JANSSEN, H., WUBBOLT, R., NEEFJES, J. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. **Current Biology**, v. 11, n. 21, p. 1680-1685, 2001.

MAH, T., O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MORATO, C. I., SILVA JR, I. A., BORGES, A. F., DORTA, M. L., OLIVEIRA, M. A. P., JANCAR, S., SEREZANI, C. H., RIBEIRO-DIAS, F. Essential role of leukotriene B4 on *Leishmania*(Viannia) *braziliensis* killing by human macrophages. **Microbes and Infection**. v. 16, n. 11, p. 945-953, 2014.

OLSON, M. E., CERI, H., MORCK, D. W., BURET, A. G., READ, R. R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86-92, 2002.

ORY, S., GASMAN, S.. Rho GTPases and exocytosis: what are the molecular links?. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2011. p. 27-32.

POTERYAEV D, DATTA S, ACKEMA K, ZERIAL M, SPANG A Identification of the switch in early-to-late endosome transition. **Cell**, v. 141, n. 3, p. 497–508, 2010.

SAMPAIO, P. G. **Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *Corynebacterium pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFBA – Salvador, p. 47, 2012.

SOUZA, A. P. **Avaliação *in vitro* de aspectos da resposta imune à *Corynebacterium pseudotuberculosis* atenuada e selvagem**. Tese (Doutorado em Imunologia). UFBA – Salvador, p. 123, 2014.

SUN, J., DEGHRANE, A. E., SOUALHINE, H., HONG, T., BUCCI, C., SOLODKIN, A., HMAMA, Z. *Mycobacterium bovis* BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 6, p. 1437-1445, 2007.

SZATMÁRI, Z., SASS, M. The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: a review. **Autophagy**, v. 10, n. 7, p. 1154-1166, 2014.

VIEIRA, O. V., BOTELHO, R. J., GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: aging gracefully. **Biochemical Journal**, v. 366, n. 3, p. 689-7004, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A técnica de extração de moléculas estruturais hidrofóbicas por solventes orgânicos resultou em frações de membranas com antigenicidade comprovada;
- ✓ O reconhecimento antigênico por IgG das moléculas de 37 kDa, 49 kDa e 64 kDa ocorreu em ambas as cepas de *C. pseudotuberculosis* estudadas (produtora e não produtora de biofilme) e constituem promissores candidatos para purificação e desenvolvimento de testes diagnósticos;
- ✓ Caprinos infectados experimentalmente com *C. pseudotuberculosis* produtor e não produtor de biofilme respondem a exposição primária, o que contribui para o aumento da imunoglobulina IgG, com grandes amplitudes a partir de 14 dias após infecção;
- ✓ Todos os antígenos extraídos de *C. pseudotuberculosis* tanto da cepa produtora quanto da não produtora de biofilme apresentaram antigenicidade, mas a cepa produtora de biofilme apresentou melhor sensibilidade e melhor especificidade nos ensaios imunoenzimáticos realizados;
- ✓ A produção do INF- γ foi observada nos dois grupos infectados, porém a bactéria produtora de biofilme possui um mecanismo de escape que aumenta a produção de INF- γ e mostra que essa citocina é produzida por estimulação específica;
- ✓ O perfil hematológico dos caprinos infectados com *C. pseudotuberculosis* produtor e não produtor de biofilme apresentam resposta semelhante tanto na infecção aguda, quanto na infecção crônica;

✓ Cepas de *C. pseudotuberculosis* produtora e não produtora de biofilme podem alterar a expressão de proteínas Rab em macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico cultivados *in vitro*.

PERSPECTIVAS

- Estão sendo conduzidos análises de extratos de proteínas totais das cepas de *C. pseudotuberculosis* Cap3W e CapJ4, através da espectrometria de massa. Essa caracterização está sendo realizada em colaboração com o Laboratório AQUACEN da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, coordenado pelo Prof. Dr. Henrique Figueiredo;
- A determinação da concentração de haptoglobina sérica, um marcador de fase aguda de processos inflamatórios e infecciosos mais sensíveis para ruminantes, está em fase de conclusão;
- A determinação das concentrações de bioquímicos ureia, creatinina, TGP (transaminase glutâmico-piruvico), TGO (transaminase glutâmico-oxalacética), PCR (proteína C reativa) e fosfatase alcalina (FA), também estão em fase de conclusão e foram utilizados Kits comerciais da Wiener lab group para metodologia;
- A padronização dos antígenos de membrana e das proteínas recombinantes com uma maior quantidade de soros de animais naturalmente infectados deverá ser realizada, bem como a caracterização destes antígenos *in vivo* em modelos caprinos e ovinos, objetivando a identificação de potenciais imunógenos contra a linfadenite caseosa.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, 532p.

ADHIKARI, A., RAUNIYAR, R., RAUT, P. P., MANANDHAR, K. D., Gupta, B. P. Evaluation of sensitivity and specificity of ELISA against Widal test for typhoid diagnosis in endemic population of Kathmandu. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2015.

AL-GAABARYA, M. H., OSMAN, S. A., AHMED, M. S., OREIBY, A. F. Abattoir survey on caseous lymphadenitis in sheep and goats in Tanta, Egypt. **Small Ruminant Research**, v. 94, p. 117-124, 2010.

ALLEN, C. E., SCHMITT, M. P. HtaA is an iron-regulated hemin binding protein involved in the utilization of heme iron in *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 8, p. 2638-2648, 2009.

ALMEIDA, S., TIWARI, S., MARIANO, D., SOUZA, F., JARNAL, S. B., COIMBRA, N., RAITTZ, R. T., DORELLA, F. A., CARVALHO, A. F., PEREIRA, F. L., SOARES, S. C., LEAL, CARLOS, A. G., BARH, D., GHOSH, P., FIGUEIREDO, H., MOURA-COSTA, L. F., PORTELA, R. W., MEYER, R., SILVA, A., AZEVEDO, A. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.

ALVES F. S. F., SANTIAGO L. B., PINHEIRO R. R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. **Documentos, Embrapa Caprinos**, Sobral. 2007, 60p.

AMANSO, E. S. **Enzima superóxido dismutase em isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtidos de pequenos ruminantes**. Dissertação (Dissertação em ciências veterinária), UNIVASF- Petrolina, p. 60, 2015.

ANDRADE, J. S. L., AZEVEDO, S. S., TELES, J. A., HIGINO, S. S. S., AZEVEDO, E.O. Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.2, p. 116-120, 2012.

ARMENTIA, M. M. L., AMAYA, C., COLOMBO, M. I. Rab GTPases and the autophagy pathway: bacterial targets for a suitable biogenesis and trafficking of their own vacuoles. **Cells**, v. 5, n. 1, p. 11, 2016.

AZEVEDO, V. A. C., GUIMARÃES, A.S., OLIVEIRA, C. A. A., SEYFFERT, N., DORELLA, F. A., ALMEIDA, S. S., MYOSHI, A., GOUVEIA, A. M.G. **Teste de pele para diagnóstico da Linfadenite Caseosa subclínica em caprinos e ovinos**. Minas Gerais, Brasil. Patente BR PI 1102202-7 A2, 2016.

AZIZ, R. K., BARTELS, D., BEST, A. A., DeJONGH, M., DISZ, T., EDWARDS, R. A. FORMSMA, K., GERDES, S., GLASS, E. M., KUBAL, M., MEYER, F., OLSEN, G. J.,

OSTERMAN, A. L., OVERBEEK, R. A., McNEIL, L. K., PAARMANN, D., PACZIAN, T., PARRELO, B., PUSCH, G. D., REICH, C., STEVENS, R., VASSIEVA, O., VONSTEIN, V., WILKE, A., ZAGNITKO, O. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.

BAIRD, G. J., FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n.4, p. 179-210, 2007.

BAIRD, G. J., MALONE, F. E. Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA testing. **Veterinary Record**, v. 166, p. 358-362, 2010.

BALES, P. M., RENKE, E. M., MAY, S. L., SHEN, Y., NELSON, D. C. Purification organisms and other pathogens. **PLOS One**, v. 8, n.6, p. e67950, 2013.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A. A., DVORKIN, M., KULIKOV, A. S., LESIN, V. M., NIKOLENKO, S. I., PHAM, S., PRJIBELSKI, A. D., PYSHKIN, A., V., SIROTKIN, A. V., VYAHHI, N., TESLER, G. ALEKSEYEV, M. A., PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm its applications to single cell sequencing. **Journal of computational biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BASTOS, B. L. **Resposta imune de ovinos a antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotuberculosis* associados a saponinas de *Quillaja saponaria* como adjuvantes e prospecção de antígenos somáticos com potencial aplicabilidade em sistemas de imunodiagnóstico.** Tese (Doutorado em imunologia), UFBA – Salvador, p. 92, 2011.

BASTOS, B. L., PORTELA, R. W. D., DORELLA, F. A., RIBEIRO, D., SEYFFERT, N., CASTRO, T. L. P., MIYOSHI, A., OLIVEIRA, S. C., MEYER, R., AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological responses in animal and zoonotic potential. **Journal Clinical & Cellular Immunology**, p. 2-15, 2012. Doi: 10.4172/2155-9899.S4-005.

BELOIN, C., GHICO, J. M. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 16-19, 2005.

BHUIN, T., ROY, J. K. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. **Exp Cell Res**. V. 328, n. 1, p. 1-19, 2014.

BILLINGTON, S. J., ESMAY, P.A., SONGER, E. J., JOST, B. H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, n. 1, p. 41-45, 2002.

BOGDAN, J. R., NEWLANDS-MONTEITH, C. F., ELLIS, J. A. Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 299-310, 1997.

BRASIL. Manual técnico do programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal – PNCEBT. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 2006. 184 p.

BRUNE, I., WERNER, H., HUSTER, A. T., KALINOWSKI, J., PUHLER, A., TAUCH, A. The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 21, 2006.

CARMINATI, R., BAHIA, R., DE MOURA COSTA, L. F., PAULE, B. J. A., VALE, V. L., REGIS, L., MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 1, p. 88-93, 2003.

CARVALHO, D. M., SÁ, P. H., CASTRO, T. L. P., CARVALHO, R. D., PINTO, A., GIL, D. J. P., BAGANO, P., BASTOS, B., MOURA-COSTA, L. F., MEYER, R. SILVA, A., AZEVEDO, V., RAMOS, R. T. J., PACHECO, L. G. C. Reference genes for RT-qPCR studies in *Corynebacterium pseudotuberculosis* identified through analysis of RNA-seq data. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 4, p. 605-614, 2014.

CHAI, Y., CHU, F., KOLTER, R., LOSICK, R. Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, V. 67, n. 2, p. 254-263, 2008.

CLARY, G., SASINDRAN, S., NESBITT, N., MASON, L., COLE, S., AZAD, A., McCOY, K., SCHLESINGER, L. S., HALL-STOODLEY, L. *Mycobacterium abscessus* Smooth And Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes But Are Killed by Acetic Acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, AAC-01782, 2018.

CLEMENS, D. L., LEE, B. Y., HORWITZ, M. A. Deviant expression of Rab 5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. **Infection and Immunity**, v. 68, n.5, p. 2671-2684, 2000.

CONTIGuator > GALARDINI, M. et al. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. **Source code for biology and medicine**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., GREEBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n.21, p. 318-322, 1999.

DESJARDINS, M., HUBER, L. A. PARTON, R. G., GRIFFITHS, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. **The Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 5, p. 677-688, 1994.

DORELLA, F. A. PACHECO, L. G. C., OLIVEIRA, S.C. MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 201-218, 2006.

DROPPA-ALMEIDA, D., VIVAS, W. L. P., SILVA, K. K. O., REZENDE, A. F. S., SIMONATTO, S., MEYER, R., LIMA-VERDE, I. B., DELAGOSTIN, O., BORSUK, S., PADILHA, F. F. Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, p.1091-1096, 2016.

FALISSE-POIRRIER, N., RUELLE, V., ELMOUALIJ, B., ZORZI, D., PIERARD, O., HEINEN, E., DE PAUW, E., ZORZI, W. Advances in immunoproteomics for serological characterization of microbial antigens. **Journal Microbiological Methods**, v. 67, p. 593-596, 2006.

FALKINHAM III, J.O. Growth in catheter biofilms and antibiotic resistance of *Mycobacterium avium*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 250-254, 2007.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. World agriculture towards 2030/2050 – The 2012 revision. Disponível em: <http://environmentportal.in/files/file/world/%20agriculture%20towards%202030.pdf>. Acesso em 02/01/2018.

FLANNAGAN, R. S., COSÍO, G., GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 355, 2009.

FLEMMING, H.C., WINGENDER, J. The biofilm matrix, **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

FONTAINE, M. C., BAIRD, G., CONNOR, K. M., RUDGE, K., SALES, J., DONACHIE, W. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Vaccine**, v. 24 n. 33-34, p. 5986-5996, 2006.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1, p. 42-48, 2008.

FORESTIER, C., BILLARD, E., MILON, G., GUEIRARD, P. Unveiling and Characterizing Early Bilateral Interactions between Biofilm and the Mouse Innate Immune System. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2309. p. 1-7, 2017.

FRATTI, R. A., BACKER, J. M., GRUENBERG, J., CORVERA, S., DERETIC, V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 3, p. 631-644, 2001.

GALARDINI, M., BIONDI, E. G., BAZZICALUPO, M., MENGONI, A. CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes. **Source Code for Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011.

GALVÃO, I. E., FRAGOSO, S. P., OLIVEIRA, C. E., FORNER, O., PEREIRA, R. R. B., SOARES, C. O., ROSINHA, G. O. S. Identification of new *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens by immunoscreening of gene expression library. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 202, 2017.

GEISSMANN, F., JUNG, S., LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v.19, n. 1, p. 71-82, 2003.

GEISSMANN, F., MANZ, M.G., JUNG, S., SIEWEKE, M.H., MERAD, M., LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n.5966, p. 656-661, 2010.

GUEDES, C. M.C., UCHOA, F. SAMPAIO, R. R. O monitoramento de desempenho está alinhado com a estratégia? Observação em frigoríficos da caprinovinocultura da Bahia. **REGE**, v. 19, n. 3, p. 411-429, 2012.

GUIMARÃES, A. S., CARMO, F. B., PAULETTI, R. B., SEYFFERT, N., RIBEIRO, D., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G. caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis and control. **The IIOAB Journal**, v.2, n.2, p.33-43, 2011.

GUIMARÃES, A. S., DORNELES, E. M., ANDRADE, G. I., LAGE, A. P., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G., HEINEMANN, M. B. Molecular isolates using ERIC-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 153, p. 299-306, 2011a.

GUIMARÃES, A. S., SEYFFERT, N., BASTOS, B. L., PORTELA, R. W. D., MEYER, R., CARMO, F. B., CRUZ, J. C. M., MCCULLOCH, J. A., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. **Small Ruminant Research**, v. 87, n. 1-3, p. 86-91, 2009.

HALDAR, A., PAL, P., DATTA, M., PAUL, R., PAL, S. K., MAJUMDAR, D., BISWAS, C. K., PAN, S. Prolificacy and its relation ship with age, body weigth, parity, previous litter size and body linear type traits in meat-type goats. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n.5, p. 628-634, 2014.

HARD, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 6, p. 1439-1449, 1975.

HASSAN, S. S., TIWARI, S., GUIMARÃES, L. C., JAMAL, S. B., FOLADOR, E., SHARMA, N. B., SOARES, S. C., ALMEIDA, S., ALI, A., ISLAM, A., PÓVOA, F. D., ABREU, V. A. C., JAIN, N., BHATTACHARYA, A., JUNEJA, L., MIYOSHI, A., SILVA, A., BARH, D., TURJANSKI, A. G., AZEVEDO, V. FERREIRA, R. S. Proteome scale comparative modeling for conserved drug and vaccine targets identification in *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Genomics**. V. 15, n. 7, p. S3, 2014.

- HODGSON, A. L. M., CARTER, K., TACHEDJIAN, M., KRYWULT, J., CORNER, L. A., McCOLL, M., CAMERON, A. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis*, phospholipase D. **Vaccine**, v. 17, p. 802-808, 1999.
- HODGSON, A.L., KRYWULT, J., CORNER, L.A., ROTHEL, J.S., RADFORD, A.J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2900-2905, 1992.
- HOELZLE, L. E., SCHERRER, T., MUNTWYLER, J., WITTENBRINK, M. M., PHILIPP, W., HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, v. 164, p. 359-365, 2013.
- HOLT, J. G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Holt J. G., Krieg N.R., Sneath P. H.A., Staley J. T(Eds)., **Bergeys's manual of determinative bacteriology**, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994. p. 593.
- HUTAGALUNG, A. H., NOVICK, P. J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 119-149, 2011.
- IBTISAM, M. A. Some clinicopathological and pathological studies of *C. ovis* infection in sheep. **Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology**, v. 21, n.1, p. 327-343, 2008.
- ISHIDA, S., ARAI, M., NIIKAWA, H., KOBAYASHI, M. Inhibitory effect of cyclic trihydroxamate siderophore, desferrioxamine E, on the biofilm formation of *Mycobacterium* species. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 6. p. 917-920, 2011.
- JENKINS, S. J., RUCKERL, D., COOK, P. C., JONES, L. H., FINKELMAN, F. D., VAN ROOIJEN, N., MACDONALD, A. S., ALLEN, J. E. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of th2 inflammation. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1284-1288, 2011.
- JOHANSSON, M., ROCHA, N., ZWART, W., JORDENS, I., JANSSEN, L., KUIJL, C., OLKKONEN, V. M., NEEFJES, J. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150^{Glued}, ORP1L, and the receptor β III spectrin. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 4, p. 459-471, 2007.
- JONES, G. E., MOULD, D. L. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobin to a microtitration plate system. **Research in Veterinary Science**, v. 37, p. 87-92, 1984.
- JORDENS, I., FERNANDEZ-BORJA, M., MARSMAN, M., DUSSELJEE, S., JANSSEN, L., CALAFAT, J., JANSSEN, H., WUBBOLT, R., NEEFJES, J. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. **Current Biology**, v. 11, n. 21, p. 1680-1685, 2001.

KIM, S., OH D. B., KANG, H. A., KWON, O. Features and applications of bacterial sialidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 1-15, 2011.

LI, Q., JIAO, W., YIN, Q., XU, F., LI, J., SUN, L., XIAO, J., LI, Y., MOKROUSOV, I., HUANG, H., SHENA, D. Compensatory mutations of rifampin resistance are associated with transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2807-2812, 2016.

LIU, H. W., ZHONG, R. Z., ZHOU, D. W., SUN, H. X., ZHAO, C. S. Effects of lairage time after road transport on some blood indicators of welfare and meat quality traits in sheep. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition**, v.96, n.6, p. 1127-1135, 2012.

LU, T. K., COLLINS, J. J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 27, p. 11197-11202, 2007.

MAH, T., O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAHANKALI, M., ALTER, G., GOMEZ-CAMBRONERO. Mechanism of enzymatic reaction and protein-protein interactions of *pld* from a 3D structural model. **Cell Signal**, v. 27, n.1, p. 69-81, 2015.

MAHMOOD, Z. K. H., JESSE, F. F., SAHAREE, A. A., JASNI, S., YUSOFF, R., WAHID, H. Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its exotoxin (phospholipase D): A comprehensive study in goat. **Veterinary World**, v. 8, n. 9, p.1105-1117, 2015.

MAHMOOD, Z. K., JIN, Z. A. M., JESSE, F. F., SAHAREE, A. A., SABRI, J., YUSOFF, R., HARON, A. W. Relationship between the *Corynebacterium pseudotuberculosis*, phospholipase D inoculation and the fertility characteristics of crossbred Boer bucks. **Livestock Science**, v. 191, p. 12-21, 2016.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA – Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprilos-e-ovinos/saiba-mais>, acesso em 02.01.2018.

MARCHIORO, S. B., SIMIONATTO, S., GALLI, V., CONCEIÇÃO, F. R., BRUM, C. B., FISCH, A., GOMES, C. K. DELLAGOSTIN, O. A. Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 1, p. 44-52, 2012.

MARGUILES, M., EGHOLM, M., ALTMAN, W. E., ATTIYA, S. BADER, J. S. BEMBEN, L. A., BERKA, J., BRAVERMAN, M. S., CHEN, Y., CHEN, Z., DEWELL, S. B., DU, L., FIERRO, J. M., GOMES, X. V., GODWIN, B. C., HE, W., HELGESEN, S., HO, C. H., IRZYK, G. P., JANDO, S. C., ALENQUER, M. L. I., JARVIE, T. P., JIRAGE, K. B., KIM, J. B., KNIGHT, J. R., LANZA, J. R., LEAMON, J. H., LEFKOWITZ, S. M., LEI, M., LI, J., LOHMAN, K. L., LU, H., MAKHJIJANI, V. B.,

McDADE, K. E., McKENNA, M. P., MYERS, E. W., NICKERSON, E., NOBILE, J. R., PLANT, R., PUC, B. P., RONAN, M. T., ROTH, G. T., SARKIS, G. J., SIMONS, J. F., SIMPSON, J. W., SRINIVASAN, M., TARTARO, K. R., TOMASZ, A., VOGT, K. R., VOLKMER, G. A., WANG, S. H., WANG, Y., WEINER, M. P., YU, P., BEGLEY, R. F., ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–80, 2005.

MARIANO, D. C. B., SOUSA, T. J., PEREIRA, F. L., ABURJAILE, F., BARH, D., ROCHA, F., PINTO, A. C., HASSAN, S. S., SARAIVA, T. D. L., DORELLA, F. A., CARVALHO, A. F., LEAL, C. A. G., FIGUEIREDO, H. C. P., SILVA, A., RAMOS, J. R. T., AZEVEDO, V. A. C. Whole-genome optical mapping reveals a mis-assembly between two rRNA operons of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 315, 2016.

MARINO, S., CILFONE, N. A., MATTILA, J. T., LINDERMAN, J. J., FLYNN, J. L., KIRSCHNER, D. E. Macrophage polarization drives granuloma outcome during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 324– 338, 2015.

MEYER, R., REGIS, L., VALE, V., PAULE, B., CARMINATI, R., BAHIA, R. MOURA-COSTA, L., SCHAEER, R., NASCIMENTO, I., FREIRE, S. *In vitro* IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.107, n. 3, p. 249-254, 2005.

MEYER, R., CARMINATI, R., CERQUEIRA, R. B., VALE, V., VIEGAS, S., MARTINEZ, T., NASCIMENTO, I., SCHAEER, R., SILVA, J. A. H., RIBEIRO, M., REGIS, L., PAULE, B., FREIRE, S.M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 42-48, 2002.

MORAES, P. M. R., SEYFFERT, N., SILVA, W. M., CASTRO, T. L. P., SILVA, R. F., LIMA, D. D., HIRATA JR., R., SILVA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. Characterization of the Opp Peptide Transporter of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in virulence and pathogenicity. **Biomed Research International**, v.2014, ID 489782, p. 1-7, 2014.

MORATO, C. I., SILVA JR, I. A., BORGES, A. F., DORTA, M. L., OLIVEIRA, M. A. P., JANCAR, S., SEREZANI, C. H., RIBEIRO-DIAS, F. Essential role of leukotriene B4 on *Leishmania*(*Viannia*) *braziliensis* killing by human macrophages. **Microbes and Infection**. v. 16, n. 11, p. 945-953, 2014.

MOTTOLA, G., BOUCHERIT, N., TROUPLIN, V., BARRY, A.O., SOUBEYRANA, P., MEGE, J., GHIGO, E. *Tropheryma whipplei*, the Agent of Whipple's disease, affects the Early to late Phagosome transition and survives in a Rab5 and Rab7 – positive compartment. **Plos one**, v. 9, n. 2, p. 1-9, 2014.

MOURA-COSTA, L. F., BAHIA, R. C., CARMINATI, R., VALE, V. L. C., PAULE, B. J. A., PORTELA, R. W., FREIRE, S. M., NASCIMENTO, I., SCHAEER, R., BARRETO, L.

M. S., MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 131-141, 2008.

MOURA-COSTA, L. F., *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. **Revista de Ciências Médicas Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2002.

MURATA, H., SHIMADA, N., YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p.28-40, 2004.

MURRAY, P. J., WYNN, T. A., Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v.11, n.11, p. 723-737, 2012.

NAKANISHI, K. Basophils as APC in th2 response in allergic inflammation and parasite infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 814-820, 2010.

NAKAYA, M., TANAKA, M., OKABE, Y., HANAYAMA, R., NAGATA, S. Opposite effects of rho Family GTPases on engulfment of apoptotic cells by macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8836-8842, 2006.

NDOUTAMIA G., GANDA K. Determination des paramètres hématologiques et biochimiques des petits ruminants du Tchad. **Revue de Médecine Veterinaire**, v. 156, n. 4, p. 202-206, 2005.

NIELSEN, C. K., KJEMS, J., MYGIND, T., SNABE, T., MEYER, R. L. Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in Laboratory media. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.1-10, 2016.

ODHAH, M. N., ABDULLAH, F. F. J., HARON, A. W., LILA, M. A. M., ZAMRI-SAAD, M., KHUDER, Z., HAMBALI, I. U. UMAR, M., SALEH, W. M. Hemogram responses in goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogen mycolic acids. **Veterinary World**, v. 10, n. 6, p. 655- 661, 2017.

OLIVEIRA, M. G., NUNES, T. L., PAIVA, A. L., BEZERRA, T. C., FERNANDES, N. S., VALE, A. M. BARRETO JUNIOR, R. A., PAULA, V. V. Aspectos hematológicos de caprinos (*Capra hircus*) da raça Canindé criados no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 0, p. 4-8, 2012.

OLSON, M. E., CERI, H., MORCK, D. W., BURET, A. G., READ, R. R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86-92, 2002.

ORY, S.,GASMAN, S.. Rho GTPases and exocytosis: what are the molecular links?. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2011. p. 27-32.

PACHECO, L. G. C., SLADE, S. E., SEYFFERT, N., SANTOS, A. R., CASTRO, T. L .P., SILVA, W. M., SANTOS, A. V., SANTOS, S. G., FARIAS, L. M., CARVALHO, M.

- A. R., PIMENTA, A. M. C., MEYER, R., SILVA, A., SCRIVENS, J. H., OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, A., DOWSON, C., AZEVEDO, V. A combined approach for comparative exoproteome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **BMC Microbiology**, v.11, p.1-14, 2011.
- PAULE, B. J. A., AZEVEDO, V., MOURA-COSTA, L. F., FREIRE, S. M., REGIS, L. F., VALE, V. L. C., BAHIA, R. C., CARMINATI, R., NASCIMENTO, I., MEYER, R. SDS-PAGE and Western blot analysis of somatic and extracellular antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v 3, n.1, p. 44-52, 2004.
- PAULE, B. J. A., AZEVEDO, V., REGIS, L. F., CARMINATI, R., BAHIA, C. R., VALE, V. L. C., MOURA-COSTA, L. F., NASCIMENTO, I., SCHAER, R., GOES, A. M., MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon- γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 3, p. 129-139, 2003.
- PAWEŁCZYK, J., KREMER, L. The molecular genetics of mycolic acid biosynthesis. **American Society for Microbiology**, v. 2. n. 4, p.1-20, 2014
- PEDROSA, K.Y.F., BARRÊTO JR., R. A., COSTA, E. S., LEITE, A. I., PAULA, V. V. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na zona noroeste do Rio Grande do Norte. **Revista Caatinga**, v. 16. N. 1-2, p. 17-21, 2003.
- PÉPIN, M., SEOW, H. F., CORNER, L., ROTHEL, J. S., HODGSON, A. L., WOOS, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. **Veterinary Research**, v. 28, n. 2, p. 149-163, 1997.
- PEREIRA, S. F. F., GOSS, L., DWORKIN J. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 192-212, 2011.
- PINTO, A. C., SÁ, P. H. C. G., RAMOS, R. T. J., BARBOSA, S., BARBOSA, H. P. M., RIBEIRO, A. C., SILVA, W. M., ROCHA, F. S., SANTANA, M. P., CASTRO, T. L. P., MIYOSHI, A., SCHNEIDER, M. P., SILVA, A., AZEVEDO, V. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 14, 2014.
- PIONTKOWSKI, M. D., SHIVVERS D. W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n.11, p. 1765-1768, 1998.
- POTERYAEV D, DATTA S, ACKEMA K, ZERIAL M, SPANG A Identification of the switch in early-to-late endosome transition. **Cell**, v. 141, n. 3, p. 497–508, 2010.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 115-122p, 2005.

QUINN, P.J., MARKEY, B.K., LEONARD, F.C., FITZPATRICK, E.S., FANNING, S., HARTINGAN, P.J. **Clinical Veterinary Microbiology**, WOLFE, 1994, 648p.

REBOUÇAS, M. F., LOUREIRO, D., BASTOS, B. L., MOURA-COSTA, L. F., HANNA, S. A., AZEVEDO, V. R. MEYER., PORTELA, R. W. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1296-1302, 2013.

REBOUÇAS, M. F., PORTELA, R. W., LIMA, D. D., LOUREIRO, D, BASTOS, B. L., MOURA-COSTA, L. F., VALE, V. L., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., MEYER, R. *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted antigen-induced specific gamma-interferon production by peripheral blood leukocytes: potential diagnostic marker for caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 213-220, 2011.

REES, M. A., KLEIFELD, O., CRELLIN, P. K., HO, B., STINEAR, T. P., SMITH, A. L., COPPEL, R. L. Proteomic characterization of a natural host-pathogen interaction: repertoire of in vivo expressed bacterial and host surface-associated proteins. **Journal of proteome research**. v. 14, n. 1, p. 130-132, 2015.

RENEAUDEAU, D., COLLIN, A., YAHAV, S., BASILIO, V., GOURDINE, J. L., COLLIER, R. J. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. **Animal**, v. 6, n.5, p. 707-728, 2012.

REZENDE, A. D. F. S., BRUM, A. A., REIS, C. G., ANGELO, H. R., LEAL, K. S., DE OLIVEIRA SILVA, M. T., SIMIONATTO, S., AZEVEDO, V., SANTOS, A., PORTELA, R. W., DELLAGOSTIN, O., BORSUK, S. O. *In silico* identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigenic targets and application in immunodiagnosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 521-529, 2016.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. 1ª ed. São Paulo: Nobel, 1997

RIET-CORREA, B., RIET-CORREA, G., RIET-CORREA, F. Plantas que causam alterações mecânicas ou traumáticas em ruminantes e equinos, com ênfase em *Stipa* spp.(Gramineae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n. 6, p. 516-520, 2011.

ROGERS, E. A., DAS, A., TON-THAT, H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. In: LINKE D. GOLDMAN. (eds) Bacterial Adhesion. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 715, p. 91-103, 2011.

RUIZ, J.C., D' AFONSECA, V., SILVA, A. ALI, A., PINTO, A.C., SANTOS, A.R., ROCHA, A.A.M., LOPES, D.O., DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., COSTA, M.P., TURK, M.Z., SEYFFERT, N., MORAES, P.M.R.O., SOARES, S.C., ALMEIDA, S.S., CASTRO, T.L.P., ABREU, V.A.C., TROST, E., BAUMBACH, J. TAUCH, A., SCHNEIDER, M.P.C., MCCULLOCH, J., CERDEIRA, L.T., RAMOS, R.T.J., ZERLOTINI, A., DOMINITINI, A., RESENDE, D.M., COSER, E.M., OLIVEIRA, L.M., PEDROSA, A.L., VIEIRA, C.U.V., GUIMARÃES, C.T., BARTHOLOMEU, D.C.,

OLIVEIRA, D.M., SANTOS, F.R., RABELO, E.M., LOBO, F.P., FRANCO, G.R., COSTA, A.F., CASTRO, L.M., DIAS, S.R.C., FERRO, J.A., ORTEGA, J.M., PAIVA, L.V., GOULART, L.R., ALMEIDA, J.F.; FERRO, M.I.T., CARNEIRO, N.P., FALCÃO, P.R.K., GRYNBERG, P., TEIXEIRA, S.M.R., BROMMONSCHENKEL, S., OLIVEIRA, S.C., MEYER, R., MOORE, R.J., MIYOSHI, A., OLIVEIRA, G.C., AZEVEDO, V. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. 1-16, 2011.

RUMJANEK, N. G., FONSECA, M. D., XAVIER, G. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 33, p. 35-50, 2004.

RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J., HORSNELL, T., RICE, P., RAJANDREAM, M. A., BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

SÁ, M. C. A., GOUVEIA, G. V., KREWER, C. C., VESCHI, J. L. A., MATTOS-GUARALDI, A. L., COSTA, M. M. Distribution of *pld* and Fag A, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 265-268, 2013a.

SÁ, M. C. A., VESCHI, J. L. A., SANTOS, G. B., AMANSO, E. S., OLIVEIRA, S. A. S., MOTA, R. A., VENERONI-GOUVEIA, G., COSTA, M. M. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1319-1324, 2013.

SAHIRATMADJA, E., ALISJAHBANA, B., DE BOER, T., ADNAN, I., MAYA, A., DANUSANTOSO, H., NELWAN, R. H. H., MARZUKI, S., VAN DER MEER, J. W. M., VAN CREVEL, VAN DE VOSSE, E., OTTENHOFF, T. H. M. Dynamic changes in pro-and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 820-829, 2007.

SAMPAIO, B., SAMPAIO, Y., LIMA, R.C., AIRES, A., SAMPAIO, G. A Economia da Caprinocultura em Pernambuco: Problemas e Perspectivas, **Revista de Economia**, v. 35, n. 2, p. 137-159, Editora UFPR, 2009.

SAMPAIO, P. G. **Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *Corynebacterium pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFBA – Salvador, p. 47, 2012.

SANTANA-JORGE, K. T., SANTOS, T. M., TARTAGLIA, N. R., AGUIAR, E. L., SOUZA, R. F., MARIUTTI, R. B., EBERLE, R. J., ARNI, R. K., PORTELA R. W., AZEVEDO, V. Putative virulence factors of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41: vaccine potential and protein expression. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 83, 2016.

SANTOS, R. A., CARNEIRO, A., GALA-GARCIA, A., PINTO, A., BARH, D., BARBOSA, E., ABURJAILE, F., DORELLA, F., ROCHA, F., GUIMARÃES, L., ZURITA-TURK, M., RAMOS, R., ALMEIDA, S., SOARES, S., PEREIRA, U., ABREU, V. C., SILVA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. The *Corynebacterium pseudotuberculosis* *in silico* predicted pan-exoproteome. **BMC Genomics**, v. 13, n. 5. P. S6, 2012.

SCHMITT, M. P. Analysis of a DtxR-like metalloregulatory protein, MntR, from *Corynebacterium diphtheriae* that controls expression of an ABC metal transporter by an Mn²⁺ dependent mechanism. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 24, p. 6882-6892, 2002.

SELIM, S. A., MOHAMED, F. H., HESSAIN, A.M., MOUSSA, I. M. Immunological characterization of diphtheria toxin recovered from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23 n. 2, p. 282-287, 2016.

SEYFFERT, N., SILVA, R. F., JARDIN, J., SILVA, W.M., PAULA, C. T. L., TARTAGLIA, N. R., OLIVEIRA, S. K. T., PORTELA, R. W., SILVA, A., MIYOSHI, A., LOIR, Y., AZEVEDO, V. Proteome analysis of *Corinebacterium pseudotuberculosis* isolated from diferente hosts reveals novel candidates for prophylactics to control caseous lymphadenitis. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n.1-2, p. 255-260, 2014.

SHADNEZHAD, A., NAEGELI, A., COLLIN, M. Cp40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo- β -Nacetylglucosaminidase. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 26, p. 1-10, 2016.

SILVA, W. M., SEYFFERT, N., SANTOS, A. V., CASTRO, T. L. P., PACHECO, L. G. C., SANTOS, A. R., CIPRANDI, A., DORELLA, F. A., ANDRADE, H. M., BARH, D., PIMENTA, A. M. C., SILVA, A., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. **Microbioly Pathogenesis**, v. 61-62, p. 37-42, 2013.

SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S. B., HARTWIG, D., GALLI, V., CARLESSI, R. M., MUNARI, F. M. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *E. coli* systems. Protein Expression and purification, v. 69, n. 2, p. 132–136, 2010.

SOARES, S. C., ABREU, V. A. C., RAMOS, R. T. J., CERDEIRA, L., SILVA, A., BAUMBACH, J., TROST, E., TAUCH, A., HIRATA Jr. R., MATTOS-GUARALDI, A. L., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. PIPS: Pathogenictu Island Prediction Software. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2012.

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

SOUZA, A. P. **Avaliação *in vitro* de aspectos da resposta imune à *Corynebacterium pseudotuberculosis* atenuada e selvagem**. Tese (Doutorado em Imunologia). UFBA – Salvador, p. 123, 2014.

SOUZA, C., DOS ANJOS LOPES, S. T., BATINA, P. N., CECIM, M., CUNHA, C. M., DE CARVALHO CONRADO, A., BECK, A. Estresse parasitário em cabras Saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 17-23, 2006.

SOUZA, M. F., CARVALHO, A. A., GARINO Jr., F. RIET-CORREA, F. Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 224-230, 2011.

SPANO, S., GALAN, J. E. Taking control: hijacking of Rab GTPases by intracellular bacterial pathogens. **Journal Small GTPases**, v. 0, n. 0, p. 1-10, 2017.

STEFANSKA, I., GIERYNSKA, M., RZEWUSKA, M., BINEK, M. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 13, n. 1, p. 143-149, 2010.

SUN, J., DEGHMANE, A. E., SOUALHINE, H., HONG, T., BUCCI, C., SOLODKIN, A., HMAMA, Z. *Mycobacterium bovis* BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 6, p. 1437-1445, 2007.

SUVOROVA, I. A., KOROSTELEV, Y. D., GELFAND, M. S. GntR family of bacterial transcription factors and their DNA binding motifs: structure, positioning and co-evolution. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132618, 2015.

SYAL, K. Novel method for quantitative estimation of biofilms. **Current Microbiology** v. 74, n. 10, p. 1194-1199, 2017.

SZATMÁRI, Z., SASS, M. The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: a review. **Autophagy**, v. 10, n. 7, p. 1154-1166, 2014.

TITBALL, R.W. Bacterial phospholipases C. **Microbiological Reviews**, v. 57, n.2, p. 347-366, 1993.

TRIBEDI, P., SIL, A. K., Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp AKS2 biofilm. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 20, n.6, p. 4146-4153, 2013.

TRIVEDI, A., MAVI, P. S., BHATT, D., KUMAR, A. Thiol reductive stress induces cellulose-anchored biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Communications**, v. 7, p. 11392, 2016.

TROST, E., OTT, L., SCHNEIDER, J., SCHRÖDER, J., JAENICKE, S., GOESMANN, A., HUSEMANN, P., STOYE, J., DORELLA, F. A., SOARES, S. C., D'FONSECA, V., MIYOSHI, A., RUIZ, J., SILVA, A., AZEVEDO, V., BURKOVSKI, A., GUIZO, N., JOIN-LAMBERT, O. F., KAYAL, S., TAUCH, A. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. **BMC Genomics**, v.11, n. 1, p.728-745, 2010.

VALE, V., FREIRE, S., RIBEIRO, M., REGIS, L., BAHIA, R., CARMINATI, R., PAULE, B. J. A., NASCIMENTO, I., MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n.2, p. 192-200, 2003.

VIEIRA, O. V., BOTELHO, R. J., GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: aging gracefully. **Biochemical Journal**, v. 366, n. 3, p. 689-7004, 2002.

WALBURGER, A., KOUL, A., FERRARI, G., NGUYEN, L., PRESCIANTO-BASCHONG, C., HUYGEN, K., KLEBL, B., THOMPSON, C., BACHER, G., PIETERS, J. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. **Science**, v. 304, n. 5678, p. 1800-1804, 2004.

WALKER, J., JACKSON, H., BRANDON, M.R., MEEUSEN, E. Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. **Clinical & Experimental Immunology**, v.86, p. 13-18, 1991.

WILLIAMSON, L.H. Caseous lymphadenitis in small ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.17, n.2, p. 359-371, 2001.

WYNN, T.A., BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, v. 3, n. 3, p. 245-257, 2010.

XIANG, X., DENG, W., LIU, M., XIE, J. *Mycobacterium* biofilms: Factors Involved in development, dispersal, and therapeutic strategies against biofilm-relevant pathogens. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene**, V. 24, n. 3, p. 269-279, 2014.

YEO, J. C., WALL, A. A., LUO, L., STOW, J. L. Rab 31 and APPL2 enhance FcyR-mediated phagocytosis through PI3K/Akt signaling in macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, V. 26, n.5, p. 952-965, 2015.

(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), acesso em 04/01/2018.

(<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>), acesso em 04/01/2018.

Anexo 1 – Certificado de autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



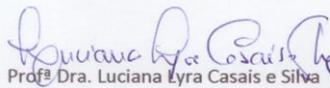
Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**ESTUDO DE PARÂMETROS DA RELAÇÃO PARASITA HOSPEDEIRO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL CAPRINA POR CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS**”, registrada com o nº 123/2017, sob a responsabilidade de Roberto José Meyer do Nascimento e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 19/05/2017

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2017 até 01/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Caprino / Canindé
Número de animais	18
Peso/Idade	10 kg / 6 meses
Sexo	Macho / Fêmea
Origem	Estação Experimental de Pequenos Ruminantes/Salinas de Margarida (BA)


Prof.ª Dra. Luciana Lyra Casais e Silva

Coordenadora da CEUA-ICS

Prof.ª Luciana Lyra Casais e Silva
Coordenadora da CEUA-ICS
Instituto de Ciências da Saúde