



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DAIANE MENDES CARVALHO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE FATORES  
SIGMA ALTERNATIVOS DA BACTÉRIA *Corynebacterium  
pseudotuberculosis* DURANTE CONTATO COM FATORES DO  
HOSPEDEIRO**

Salvador – BA  
2014

**DAIANE MENDES CARVALHO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE FATORES  
SIGMA ALTERNATIVOS DA BACTÉRIA *Corynebacterium  
pseudotuberculosis* DURANTE CONTATO COM FATORES DO  
HOSPEDEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências e Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Luis G. C. Pacheco

Salvador – BA  
2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

C331 Carvalho, Daiane Mendes

Análise da expressão diferencial de fatores sigma alternativos da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* durante contato com fatores do hospedeiro / Daiane Mendes Carvalho. – Salvador, 2014.

84 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Carvalho Pacheco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciência da Saúde, 2014.

1. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2. Interação patógeno-hospedeiro. 3. Bactéria. 4. Regulação gênica. I. Pacheco, Luis Gustavo Carvalho. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.428

**DAIANE MENDES CARVALHO**


**Análise da expressão diferencial de fatores sigma  
alternativos da bactéria *Corynebacterium  
pseudotuberculosis* durante contato com fatores do  
hospedeiro**


Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 14 de março de 2014.

**BANCA EXAMINADORA:**

Luís Gustavo Carvalho Pacheco – Orientador   
Doutor em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais,  
UFMG, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Ana Luiza de Mattos Guaraldi   
Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
UFRJ, Brasil.  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo   
Doutor em Genética de Microorganismos pelo Institut National Agronomique Paris Grignon,  
INA P-G, França.  
Universidade Federal de Minas Gerais

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado, me protegendo e me dando forças para seguir em frente e não desistir dos meus sonhos;

À minha mãe Girlene, pela oportunidade da vida, por ter me conduzido até onde estou. À Danielle, minha irmã, por ser a minha fonte de inspiração, o meu exemplo.

Ao meu namorado, Lucas, por ser o meu companheiro e sempre me incentivar a não desistir dos meus objetivos. À Deise e Demetrio, pessoas importantes na minha vida, as quais eu devo gratidão eterna, obrigada pela confiança e por tudo que me proporcionastes.

Ao meu professor e orientador Dr. Luis G. C. Pacheco por me oferecer esta oportunidade e me guiar por ela. Por me passar suas experiências e ser a minha referência de profissional.

À meus amigos do mestrado, Carine, Rafaela, Mila e Thais, agradeço pela compreensão, força e paciência.

À Priscila Bagano e Brena Mota, pela boa vontade em auxiliar a realização deste trabalho;

Ao Rommel Ramos, o bioinformata que auxiliou e contribuiu em algumas análises;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa;

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (ISC), especialmente à D. Chica pelo apoio cedido. Ao professor Dr. Roberto Meyer e Dr. Bruno Bastos por não medirem esforços em ajudar e pela acolhida no laboratório.

Ao Laboratório de Genética Celular e Molecular - UFMG, especialmente Dr. Vasco Azevedo pela acolhida no laboratório, ao Dr. Thiago Casto e Msc. Rodrigo Carvalho pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia (ICS), especialmente Professora Dra. Camila e ao Msc. Ryan pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos.

CARVALHO, Daiane Mendes. Análise da expressão diferencial de fatores sigma alternativos da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* durante contato com fatores do hospedeiro. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciência e Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## RESUMO

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo de elevada importância veterinária por ser capaz de infectar diferentes animais de produção, incluindo equinos, bovinos e pequenos ruminantes. A pesquisa recente por determinantes moleculares de virulência em diversos agentes patogênicos tem dedicado atenção às proteínas reguladoras da expressão gênica. Os fatores sigma alternativos da RNA polimerase bacteriana proporcionam um meio de regular rapidamente a expressão gênica em resposta a várias mudanças do ambiente extracelular. Nesse contexto, o presente estudo avaliou a expressão diferencial dos fatores sigma alternativos presentes no genoma da bactéria *C. pseudotuberculosis* durante contato com fatores do hospedeiro, utilizando duas estratégias experimentais, *in vivo* e *in vitro*. Ovinos foram infectados experimentalmente com uma linhagem virulenta desta bactéria, punções aspirativas foram realizadas nos linfonodos nos tempos 5, 15 e 30 dias após a infecção. Duas condições diferentes de crescimento: cultura controle, em meio Infusão Cérebro-Coração e cultura que mimetiza o crescimento no hospedeiro, Soro Fetal Bovino, foram estudadas. Curvas de crescimento bacteriano nos dois meios foram realizadas através de contagens bacterianas por monitoramento da DO<sub>595nm</sub> e citometria de fluxo. RNA total foi extraído das amostras de punção aspirativa e das culturas quando atingiram a densidade de 10<sup>7</sup> células/mL. Os cDNAs gerados por transcrição reversa *in vitro* foram submetidos a ensaios de PCR quantitativa em tempo real para a quantificação relativa dos transcritos de nove genes: *sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigK*, *sigM* e *16S rDNA*. Os genes *sigA* e *16S rDNA* foram utilizados como normalizadores da reação de PCR quantitativo, mas foi observado que o *16S rDNA* não se apresentou como um bom gene normalizador neste estudo. Assim, surgiu a necessidade de realizar um estudo com normalizadores. Foram analisados resultados de RNAseq da linhagem 1002 da *C. pseudotuberculosis*, em três condições; estresse osmótico, acidez e choque térmico. Desse modo, de 19 genes selecionados a partir estudos de normalizadores em outros gêneros, nessas condições, apenas os genes *dnaG*, *rpoC*, *gyrA*, *gyrB*, *efp*, *rpoB*, *fusA* e *atpA* cumpriram os critérios definidos para serem considerados como bons genes normalizadores. Foram analisados a expressão desses 8 genes em duas condições de cultivo, através da técnica de RT-qPCR. O NormFinder sugeriu o *gyrA* e *fusA* como os genes normalizadores mais adequados. Não foi possível analisar a expressão dos genes codificadores de fatores sigma das amostras da estratégia *in vivo*, devido à baixa concentração de RNA bacteriano das amostras de punção aspirativa. Foi possível detectar alterações nas expressões de vários genes codificadores de fatores sigma nas condições estudadas *in vitro*. O gene codificador do fator SigD foi o que apresentou maior ativação durante o crescimento bacteriano em Soro Fetal Bovino. Os resultados obtidos pelo presente trabalho sugerem o envolvimento do fator SigD na resposta adaptativa de *C. pseudotuberculosis* durante crescimento em meio que mimetiza o crescimento no hospedeiro. Após a predição de genes regulados pelo SigD foi possível observar que este fator regula a expressão de genes associados a resposta ao choque térmico, como as proteínas chaperonas, sugerindo assim a importância deste fator, sendo possivelmente importante durante o processo da infecção.

Palavras-chave: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, interação patógeno-hospedeiro, fatores sigma alternativos, regulação gênica.

CARVALHO, Daiane Mendes. Analysis of differential expression of alternative sigma factors of the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis* during contact with host factors. Dissertation (Master) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

*Corynebacterium pseudotuberculosis* is a facultative intracellular pathogen of high veterinary importance due its capacity to infect various livestock species, including horses, cattle and small ruminants. Recent research regarding the virulence molecular determinants of several pathogens have devoted attention to gene expression regulatory proteins. Alternative sigma factors of RNA polymerase provides a path by which bacteria are able to rapidly regulate its genic expression as a response to a variety of environmental changes. The aim of this study was to evaluate the differential expression of alternative sigma factors encoding genes in the bacterium *C. pseudotuberculosis* during contact with host factors, using two experimental strategies, *in vivo* and *in vitro*. Sheeps were experimentally infected with a virulent strain of the bacteria. Aspiration biopsies were performed in the lymph nodes with 5, 15 and 30 days after infection. Two different growth conditions: a control culture in Brain Heart Infusion broth and a culture in Fetal Bovine Serum, that mimetize the growth within the host, were used. Bacterial growth in both media was monitored spectrophotometrically (OD<sub>595nm</sub>) and through bacterial cell counts using flow cytometry. Total RNA was extracted from samples when these reached the concentration of 10<sup>7</sup> cells/mL. Following reverse transcription, cDNAs were employed in real time PCR reactions for relative quantification of expression of nine different *C. pseudotuberculosis* genes: *sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigK*, *sigM* e *16S rDNA*. The *sigA* and *16S rDNA* genes were used as normalizers of the quantitative PCR reaction, but it was observed that the 16S rDNA did not show as a good normalizer gene in this study and the need arose to conduct a study with normalizer genes. Herein, we searched a RNA-seq dataset from various experiments with the pathogenic strain 1002 of *C. pseudotuberculosis*, grown under different stress conditions: such as osmotic stress, low pH and heat shock, in order to select appropriate candidate reference genes for this species. Nineteen genes were evaluated throughout all growth conditions. Eight of these genes (*atpA*, *dnaG*, *efp*, *fusA*, *gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, and *rpoC*), mostly matched the defined criteria to be included as normalizers genes. Transcriptional levels of these genes were quantified by RT-qPCR assays after growth of the bacteria under two different conditions. Expression stability analysis by NormFinder indicated the genes *gyrA* and *fusA* as suitable endogenous controls for normalization of RT-qPCR studies with *C. pseudotuberculosis*. It was not possible to analyze the expression of genes encoding sigma factors of the samples by the *in vivo* strategy, due to the low concentration of bacterial RNA samples. It was possible to detect changes in expression of several genes encoding sigma factors under the conditions studied *in vitro*. The gene encoding the sigma factor sigD was the most up-regulated during growth in Fetal Bovine Serum. The results of the present study suggests the involvement of SigD factor in the adaptive response of *C. pseudotuberculosis* during growth in a culture mimicking growth within the host. After the prediction of genes regulated by SigD it was observed that this factor regulates the expression of genes associated with the response to heat shock, as chaperone-like proteins, suggesting the importance of this factor, possibly being crucial during the infection process.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Host-pathogen interaction, Sigma alternative factors, gene regulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da holoenzima RNA polimerase no sítio inicial de transcrição .....	19
Figura 2	Representação esquemática de domínios conservados em fatores sigma da família $\sigma 70$ .....	21
Figura 3	Linhagem bacteriana cultivada em caldo BHI e SFB para ensaios de Western Blot com a fração protéica F3.....	31
Figura 4	Representação esquemática da etapa inicial de curva de crescimento nos dois meios de cultura, BHI e SFB para avaliação da expressão diferencial dos fatores sigma alternativos .....	32
Figura 5	Representação esquemática da etapa inicial de curva de crescimento no meio de cultura BHI, para infecção experimental de grupo de três ovinos .....	33
Figura 6	Punção aspirativa, que foi realizada no linfonodo cervical superficial direito .....	34
Figura 7	Representação esquemática da normalização do nível de expressão do gene alvo ( <i>SigD</i> ) pela utilização de um gene normalizador ( <i>SigA</i> ) através do método $\Delta\Delta Ct$ .....	45
Figura 8	Níveis de transcrição de 19 diferentes candidatos a genes de referência de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> durante o crescimento em diferentes condições ambientais .....	50
Figura 9	Determinação da eficiência de amplificação para os pares de iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR .....	51
Figura 10	Curvas de dissociação contínua obtidas para os produtos amplificados relativos aos transcritos do gene <i>efp</i> .....	53
Figura 11	Estabilidade de expressão para os genes candidatos a gene normalizador utilizando o <i>software</i> NormFinder .....	54
Figura 12	Crescimento da <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> em caldo infusão cérebro coração (BHI) e soro fetal bovino (SFB) .....	56
Figura 13	Dosagem de haptoglobina durante o período de infecção experimental dos ovinos .....	57
Figura 14	Dosagem da imunoglobulina IgG no acompanhamento da infecção experimental dos ovinos .....	57
Figura 15	Resultado do RT-qPCR de amostra de punção aspirativa de um ovino após 30 dias de infecção experimental .....	59
Figura 16	Curvas de dissociação contínua obtidas para os produtos amplificados relativos aos transcritos do gene <i>sigA</i> .....	60
Figura 17	Ausência de amplificação por RT-qPCR dos produtos de RNA extraídos de <i>C. Pseudotuberculosis</i> .....	60
Figura 18	Representação gráfica do nível de expressão dos genes <i>sigB</i> , <i>sigC</i> , <i>sidD</i> , <i>sigE</i> , <i>sigH</i> , <i>sigK</i> , <i>sigM</i> da <i>C. pseudotuberculosis</i> crescida no SFB em relação ao crescimento controle no meio BHI, utilizando o normalizador <i>sigA</i> .....	62
Figura 19	Representação gráfica do nível de expressão dos genes <i>sigB</i> , <i>sigD</i> , <i>sigE</i> , <i>sigH</i> da <i>C. pseudotuberculosis</i> crescida no SFB em relação ao crescimento controle no meio BHI, utilizando 8 diferentes genes normalizadores .....	63



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados no ensaio de RT-qPCR .....	38
Tabela 2 Parâmetros selecionados no termociclador para o processamento das reações de qPCR .....	38
Tabela 3 Reagentes e suas quantidades utilizadas nas reações de RT-qPCR .....	39
Tabela 4 Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados no ensaio de RT-qPCR.....	42
Tabela 5 Estabilidade de expressão do RNA de dezenove genes candidatos a genes normalizadores, calculados de acordo com dados de RNA-seq .....	49
Tabela 6 Cálculo da eficiência de amplificação dos pares de <i>primers</i> utilizados nas reações de qPCR .....	52
Tabela 7 Rendimentos das extrações de RNA total das amostras de BHI e SFB e quantidades empregadas nas reações de transcrição reversa .....	53
Tabela 8 Rendimentos das extrações de RNA total das amostras da punção aspirativa e quantidades empregadas nas reações de transcrição reversa .....	58
Tabela 9 Rendimentos das extrações de RNA total das amostras da cultura do SFB e BHI e quantidades empregadas nas reações de transcrição reversa .....	58
Tabela 10 Expressão diferencial de fatores sigma alternativos de <i>C. pseudotuberculosis</i> após crescimento em SFB .....	61
Tabela 11 Expressão diferencial do fator sigma alternativo SigD de <i>C. pseudotuberculosis</i> após crescimento em SFB .....	63
Tabela 12 Genes regulados pelo <i>sigD</i> em <i>M. tuberculosis</i> e seus correspondentes em <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BHI</b>	Infusão cérebro-coração
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>Ct</b>	= Cq (Ciclo de quantificação)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>2-ME</b>	2-mercaptoetanol
<b>ECF</b>	Função extracitoplasmática
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>FPKM</b>	<i>Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped</i>
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>ID</b>	Identificação
<b>Kb</b>	Quilobase
<b>LC</b>	Linfadenite Caseosa
<b>MFC</b>	<i>Maximum fold change</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b><math>\omega</math></b>	Ômega
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pld</b>	Fosfolipase D
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>qsp</b>	Quantidade suficiente para

<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAp</b>	RNA polimerase
<b>rpoB</b>	Subunidade beta da RNA polimerase
<b>rRNA</b>	RNA ribossômico
<b>RT-qPCR</b>	PCR quantitativa em tempo real
<b>RNAseq</b>	Sequenciamento dos transcritos de RNA
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<i>sig</i>	Gene codificador do fator sigma
$\sigma$	Fator Sigma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 LINFADENITE CASEOSA .....	15
2.2 O GÊNERO <i>Corynebacterium</i> .....	15
<b>2.2.1 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i></b> .....	16
2.2.1.1 Aspectos microbiológicos e bioquímicos .....	16
2.2.1.2 Determinantes moleculares de virulência e patogenicidade .....	16
2.2.1.2.1 Fosfolipase D .....	17
2.2.1.2.2 FagB .....	17
2.3 MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA .....	18
2.4 FATORES <i>sigma</i> BACTERIANOS .....	19
<b>2.4.1 Fatores <i>sigma</i> alternativos de <i>C. pseudotuberculosis</i></b> .....	22
<b>2.4.2 Fatores <i>sigma</i> de função extracitoplasmática (ECF)</b> .....	22
<b>2.4.3 Envolvimento de fatores <i>sigma</i> na virulência bacteriana</b> .....	23
2.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL .....	26
<b>2.5.1 Genes de referência (genes <i>housekeeping</i>) como normalizadores endógenos</b> .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 OBJETIVO GERAL .....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL .....	29
4.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS .....	30
4.3 REAGENTES UTILIZADOS .....	30
4.4 KITS DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	30
4.5 CULTIVO BACTERIANO E AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO ATRAVÉS DE DENSIDADE ÓTICA E CITOMETRIA DE FLUXO .....	31
<b>4.5.1 Citometria de fluxo</b> .....	32
4.6 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE OVINOS COM <i>C. pseudotuberculosis</i> E COLETA DE AMOSTRAS CLÍNICAS .....	33
4.7 ACOMPANHAMENTO DA INFECÇÃO .....	34
<b>4.7.1 Dosagem de IgG-anti <i>C. pseudotuberculosis</i></b> .....	35
<b>4.7.2 Dosagem de Haptoglobina (Hp)</b> .....	35

4.8 ANÁLISES TRANSCRICIONAIS .....	36
<b>4.8.1 Amostragem utilizada para obtenção de RNA total .....</b>	<b>36</b>
<b>4.8.2 Extração de RNA Total .....</b>	<b>36</b>
<b>4.8.3 Síntese de cDNA .....</b>	<b>37</b>
<b>4.8.4 PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) .....</b>	<b>37</b>
<b>4.8.5 Identificação de genes normalizadores .....</b>	<b>39</b>
<i>4.8.5.1 Análises transcricionais .....</i>	<i>41</i>
<i>4.8.5.2 Confeção de oligonucleotídeos iniciadores .....</i>	<i>41</i>
<i>4.8.5.3 PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR) .....</i>	<i>41</i>
<i>4.8.5.4 Determinação da eficiência dos iniciadores .....</i>	<i>42</i>
<i>4.8.5.5 Avaliação da estabilidade da expressão de genes normalizadores .....</i>	<i>43</i>
<b>4.8.6 Validação da ausência de DNA genômico .....</b>	<b>43</b>
<b>4.8.7 Reações para quantificação relativa e análise de expressão diferencial .....</b>	<b>44</b>
<b>4.8.8 Análise da especificidade das reações de qPCR .....</b>	<b>45</b>
4.9 PREDIÇÃO DE GENES REGULADOS PELO <i>sigD</i> .....	46
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
5.1 RESULTADOS PARTE 1: IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES .....	47
<b>5.1.1 Identificação de genes normalizadores .....</b>	<b>48</b>
<i>5.1.1.1 Determinação da eficiência dos iniciadores .....</i>	<i>51</i>
<b>5.1.2 Análises transcricionais .....</b>	<b>52</b>
<i>5.1.2.1 RNA total obtido e transcrição reversa .....</i>	<i>52</i>
<i>5.1.2.2 Reações de PCR quantitativa .....</i>	<i>53</i>
<i>5.1.2.2.1 Especificidade das reações de qPCR através de curvas de dissociação .....</i>	<i>53</i>
<i>5.1.2.2.2 Validação da ausência de DNA genômico .....</i>	<i>54</i>
<i>5.1.2.3 Avaliação da estabilidade da expressão de genes normalizadores .....</i>	<i>54</i>
5.2 RESULTADOS PARTE 2: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS FATORES SIGMA .....	55
<b>5.2.1 Curvas de crescimento da <i>C. pseudotuberculosis</i> em caldo infusão cérebro coração (BHI) e soro bovino fetal (SFB) .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.2 Acompanhamento da infecção experimental .....</b>	<b>57</b>
<b>5.2.3 Análises transcricionais .....</b>	<b>58</b>
<i>5.2.3.1 RNA total obtido e transcrição reversa .....</i>	<i>58</i>
<i>5.2.3.2 Reações de PCR quantitativa .....</i>	<i>59</i>

5.2.3.2.1 Especificidade das reações de qPCR através de curvas de dissociação .....	59
5.2.3.2.2 Validação da ausência de DNA genômico .....	60
5.2.3.2.3 Avaliação da expressão gênica diferencial utilizando o <i>sigA</i> como normalizador .....	61
5.2.3.2.4 Avaliação da expressão gênica diferencial utilizando outros Normalizadores .....	62
5.4 PREDIÇÃO DE GENES REGULADOS POR <i>sigD</i> .....	64
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	74
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

A bactéria Gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis*, pertencente ao grupo das Actinobacterias, é um patógeno intracelular facultativo de elevada importância veterinária por ser causadora de infecções crônicas em diferentes animais de produção, incluindo equinos, bovinos e pequenos ruminantes. *C. pseudotuberculosis* pode também infectar o homem, embora seja um evento relativamente raro. (DORELLA et al., 2006; TROST et al., 2010; LIU et al., 2005). O alto potencial infeccioso desta bactéria se dá pela sua capacidade de resistir a diversas condições de estresse, tanto na sua forma de vida livre no ambiente como dentro do hospedeiro, onde resiste à fagocitose e ao óxido nítrico produzido pelos macrófagos. (STEFANSKA et al. , 2010).

A doença mais prevalente causada por esta bactéria, a Linfadenite Caseosa (LC) dos caprinos e ovinos caracteriza-se pelo desenvolvimento de abscessos encapsulados em linfonodos superficiais ou viscerais e uma forma interna da doença também pode se desenvolver em órgãos como pulmão, fígado, rins, útero e baço (BAIRD E FONTAINE, 2007). Como ainda não há diagnósticos, tratamentos e métodos preventivos satisfatórios, como vacinas efetivas, para a doença, a LC é distribuída mundialmente e tem sido observada com alta frequência em países que apresentam crescimento nas atividades de ovino e caprinocultura (PATON et al., 2003; DORELLA et al., 2009). Levantamentos epidemiológicos recentes realizados no Brasil são indicativos de uma ampla prevalência da doença nos rebanhos nacionais (SEYFFERT et al., 2010).

Há ainda pouco conhecimento sobre os mecanismos moleculares de virulência e controle da expressão gênica da bactéria *C. pseudotuberculosis* (RUIZ et al., 2011). Vários estudos recentes tem se dedicado ao estudo da fisiologia desta bactéria na busca por novos determinantes moleculares que possam ter um papel definitivo na virulência (CASTRO, 2009; RUIZ et al., 2011). Tais informações serão importantes para o futuro desenvolvimento de métodos preventivos efetivos contra infecções de grande impacto (DORELLA et al., 2009).

Patógenos intracelulares, como a *C. pseudotuberculosis*, precisam se adaptar a diferentes condições ambientais ao longo do curso da infecção e precisam resistir à resposta adaptativa do hospedeiro. Assim, a resposta ao estresse ambiental representa um importante elemento que contribui para virulência desses patógenos (SCHAIBLE, 2009). Dessa forma, justifica-se

o estudo de proteínas reguladoras da expressão gênica na busca por novos determinantes moleculares de virulência (KAZMIERCZAK et al., 2005). O recente sequenciamento genômico completo de diferentes linhagens da bactéria *C. pseudotuberculosis* abriu novas possibilidades para o desenvolvimento dos estudos sobre os fatores moleculares de virulência deste microrganismo (RUIZ et al., 2011; SOARES et al., 2013).

As bactérias possuem uma classe de proteínas que constituem subunidades dissociáveis da RNA polimerase, os fatores sigma ( $\sigma$ ). A associação desses fatores  $\sigma$  com as subunidades principais da RNA polimerase é capaz de reconhecer promotores gênicos para a polimerase, redirecionando o início da transcrição de forma específica. Os fatores  $\sigma$  primários estão relacionados com a transcrição da maioria dos genes constitutivos, mas as bactérias podem responder a diferentes estímulos ambientais através da substituição do sigma primário por fatores sigma alternativos, de modo a ativar a expressão de um conjunto específico de genes envolvidos na resposta adaptativa necessária (HELMANN, 2002; KAZMIERCZAK et al., 2005, STARONÍ et al., 2009).

O presente trabalho surgiu a partir da necessidade de se compreender melhor os mecanismos de regulação da expressão gênica da *C. pseudotuberculosis*. Como a resposta aos estresses que as bactérias encontram dentro do organismo hospedeiro é mediada pelos fatores sigma alternativos da RNA polimerase, estes fatores representam um importante alvo de estudo na busca por determinantes moleculares de virulência e patogenicidade de bactérias patogênicas.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Linfadenite caseosa

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC), enfermidade que acomete populações de pequenos ruminantes em todo o mundo. Esta doença gera grandes perdas econômicas na ovinocaprinocultura devido a redução da produção de lã, perda de peso, redução da lactação, redução da capacidade reprodutiva dos animais infectados e a condenação da pele e das carcaças (ARSENAULT et al., 2003; DORELLA et al., 2006a).

Geralmente a doença é introduzida em rebanhos sadios por animais adquiridos de áreas onde há a infecção por *C. pseudotuberculosis*. A transmissão da LC ocorre através do contato direto entre os animais durante o confinamento, ou indiretamente através de materiais contaminados com secreções infectantes (SCOTT, 2007). A principal porta de entrada é a pele, assim procedimentos comuns de manejo que geram feridas na pele, como a tosa, marcações e castrações dos animais, contribuem para a disseminação da doença nos rebanhos acometidos. Williamson (2001) afirma que o microrganismo também pode penetrar através das mucosas ou até mesmo da pele intacta.

### 2.2 O gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* pertence à família dos *Corynebacteriaceae* e é agrupado no grupo supragenérico CMNR das Actinobactérias, do qual também fazem parte os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. As espécies deste grupo possuem algumas características em comum, como a organização específica da parede celular, composta por um grande complexo polimérico de peptideoglicano, arabinogalactano e ácido micólico, e são conhecidos principalmente pelo alto conteúdo de bases nitrogenadas guanina e citosina no cromossomo (SONGER, 2005; DORELLA et al., 2006a).

Algumas espécies do grupo CMNR se destacam pelo elevado potencial de emprego biotecnológico, como *Corynebacterium glutamicum* e *Corynebacterium efficiens*, importantes produtoras de aminoácidos para a indústria. Porém há também grande destaque para as espécies patogênicas, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Corynebacterium diphtheriae*,

causadoras da tuberculose e da difteria em humanos respectivamente, e a *C. pseudotuberculosis*, de grande relevância veterinária, causadora da LC (MOORE et al., 2010).

### **2.2.1 *Corynebacterium pseudotuberculosis***

#### **2.2.1.1 Aspectos microbiológicos e bioquímicos**

*C. pseudotuberculosis* é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, não possui capsula, não esporula, é imóvel e possui fímbrias. Apresenta formas pleomórficas que variam desde cocóides a bastões filamentosos medindo de 0,5 a 0,6 µm por 1,0 a 3,0 µm de tamanho (BAIRD E FONTAINE, 2007; DORELLA et al., 2006). É uma bactéria mesofílica, com condições ótimas de crescimento a 37°C em pH entre 7,0 e 7,2 e anaeróbio facultativo.

A bactéria se organiza em colônias opacas, de crescimento concêntrico e de coloração creme alaranjado, quando cultivada em meio sólido (DORELLA et al., 2006b). O crescimento é pobre em meio básico, sendo beneficiado pela adição de sangue ou soro (BAIRD E FONTAINE, 2007), pois se trata de um microrganismo exigente do ponto de vista nutricional (MOURA-COSTA, 2002). A adição de 10% de soro ou sangue de bovino ou equino propicia um crescimento bacteriano mais abundante. A bactéria é β -hemolítica, produz esfingomielinase, fosfolipase D e catalase, mas não produz oxidase (DORELLA et al., 2006a). A redução de nitrato em nitrito é variável. As linhagens de *C. pseudotuberculosis* isoladas de equinos e bovinos pertencem ao biovar *equi* e são capazes de reduzir nitrato a nitrito. Já as linhagens isoladas de ovinos e caprinos pertencem ao biovar *ovis* e não possuem atividade de redução de nitrato (WILLIAMSON, 2001; BAIRD E FONTAINE, 2007)

#### **2.2.1.2 Determinantes moleculares de virulência e patogenicidade**

Muito pouco ainda foi estudado sobre os mecanismos moleculares de virulência da *C. pseudotuberculosis*, bem como sobre o controle da sua expressão gênica. Apenas dois genes associados à virulência da *C. pseudotuberculosis* já foram estudados com mais detalhes, e suas funções são consideradas essenciais para o estabelecimento da LC: *pld* e *fagB*. O primeiro codifica uma fosfolipase D secretada com atividade de esfingomielinase (SONGER, 1997), enquanto o outro codifica um dos componentes de um sistema de permease de ferro (BILLINGTON et al., 2002).

#### **2.2.1.2.1 Fosfolipase D**

A fosfolipase D (PLD) é uma potente exotoxina produzida por *C. pseudotuberculosis* e é considerada o principal fator de virulência desta bactéria (HODGSON et al., 1999). Foi isolada pela primeira vez em *C. pseudotuberculosis* por Carne (1940), e foi encontrada por Songer et al. (1988) a sua produção em todas as linhagens isoladas. Este autor atribui à essa enzima uma importância na viabilidade de *C. pseudotuberculosis*. É um fator de permeabilidade que promove a hidrólise de ligações éster na esfingomielina enfraquecendo as membranas celulares e favorecendo a infecção nas células de mamíferos (HODGSON et al., 1990; BAIRD E FONTAINE, 2007)

Baird e Fontaine (2007) descreveram que a fosfolipase D também atua sobre o endotélio vascular, aumentando a permeabilidade e contribuindo para a disseminação do patógeno do local da infecção primária para os linfonodos, determinando necrose dérmica, agregação plaquetária e, em casos graves, falência renal.

O papel da PLD na virulência da bactéria ficou evidente após a geração de mutantes, nos quais o gene *pld* foi inativado do cromossomo, através de mutagênese sítio-específica. Infecções experimentais demonstraram que linhagens de *C. pseudotuberculosis* mutantes para o gene *pld* foram incapazes de induzirem o desenvolvimento da LC e de se disseminar dentro do hospedeiro. Sugerindo assim, que esta enzima é importante para a disseminação das bactérias do sítio de infecção até os linfonodos e as linhagens mutantes para este gene causam danos mínimos para o hospedeiro e além disso, induzem uma resposta imunológica protetora, embora não totalmente satisfatória contra *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1992).

#### **2.2.1.2.2 FagB**

Billington e colaboradores (2002) demonstraram que três genes presentes em um operon, designados *fagABC* e o gene *fagD*, tem um papel na virulência da *C. pseudotuberculosis*. Este operon está situado próximo ao gene *pld* no genoma da bactéria, e o *fagB* codifica um sistema de permease do ferro. Considerando que *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular, este deve ser capaz de adquirir ferro em um ambiente onde este nutriente é escasso. Uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* mutante para o gene *fagABC* tem habilidade reduzida de sobreviver e de desenvolver abscessos em caprinos infectados

experimentalmente, indicando que a deficiência no sistema de captação do ferro prejudica a sobrevivência da bactéria dentro do hospedeiro (BILLINGTON *et al.*, 2002).

### **2.3 Modulação da expressão gênica**

Patógenos intracelulares, como a *C. pseudotuberculosis*, precisam se adaptar às diferentes condições ambientais ao longo do curso da infecção, desde o ponto de entrada no hospedeiro, passando pelo sistema linfático, até a replicação intracelular dentro de macrófagos e o estabelecimento de lesões dentro dos órgãos (MCKEAN *et al.*, 2007a; 2007b). Durante a fase intracelular a bactéria enfrenta diversos tipos de estresses dentro do fagolisossomo, caracterizado pela presença de baixo pH, alta atividade proteolítica e grande potencial oxidativo (MCKEAN *et al.*, 2007a; ROHDE *et al.*, 2007; SCHAIBLE, 2009). A *C. pseudotuberculosis* é capaz de sobreviver às condições adversas do meio ambiente por até oito meses, antes de infectar um organismo hospedeiro (DORELLA *et al.*, 2006a; BAIRD E FONTAINE, 2007).

Certamente, mudanças na expressão gênica desempenham um papel importante nas adaptações e modificações necessárias para o desenvolvimento de uma infecção bem-sucedida por este patógeno. Fatores que regulam esses genes respondem a sinais específicos, ambientais ou celulares, para estimular, ou inibir a transcrição, ou tradução de modo a modificar adequadamente a taxa de síntese dos produtos gênicos, importantes para adaptação fisiológica e bioquímica necessária (DOW E DANIELS, 2000).

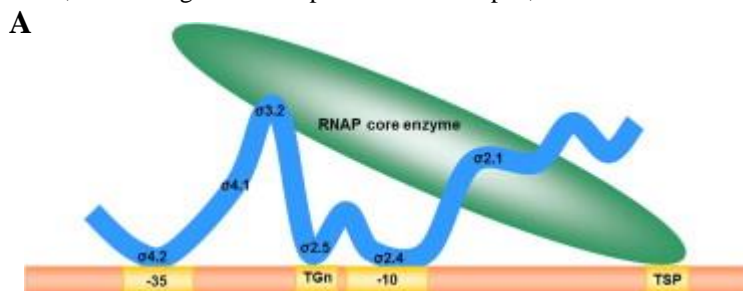
Em bactérias a modulação da expressão gênica, em nível transcricional, é realizada por uma classe de proteínas que constituem subunidades dissociáveis da RNA polimerase, os fatores sigma ( $\sigma$ ). Os fatores  $\sigma$  alternativos da RNA polimerase bacteriana proporcionam um meio de regular rapidamente a expressão gênica em resposta a várias mudanças do ambiente extracelular. (STARONÍ *et al.*, 2009).

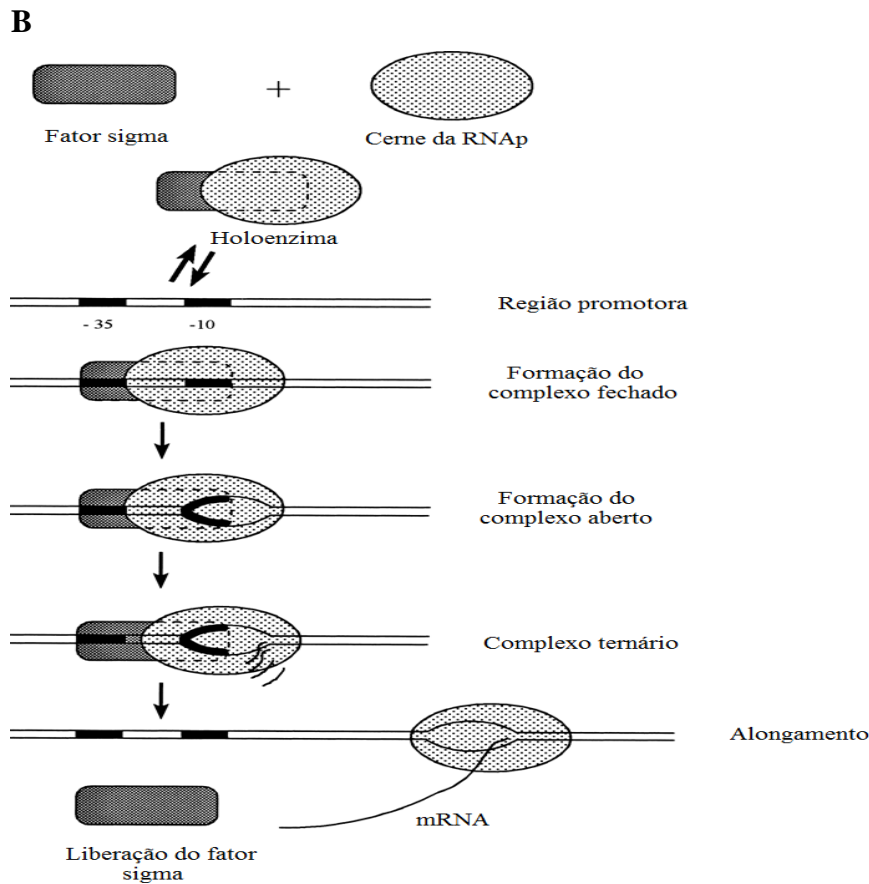
## 2.4 Fatores sigma bacterianos

As bactérias possuem uma classe de proteínas que constituem subunidades dissociáveis do cerne da RNA polimerase (RNAP), os fatores sigma ( $\sigma$ ). O cerne da RNAP é composto por cinco subunidades ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  e  $\omega$ ) e não apresenta afinidade específica pelo DNA, a associação dos fatores  $\sigma$  com as subunidades principais da RNA polimerase é capaz de reconhecer promotores gênicos para a polimerase, redirecionando o início da transcrição de forma específica (HELMANN, 2002; STARON' et al., 2009) (Figura 1).

A subunidade  $\sigma$  apresenta três funções principais: garantir o reconhecimento de sequências promotores específicas; posicionar a holoenzima RNAP no promotor; e facilitar o desenrolamento da fita dupla de DNA próximo ao sítio de início da transcrição (BROWNING e BUSBY, 2004). Assim, os fatores  $\sigma$  funcionam como reguladores globais que asseguram a expressão coordenada de conjuntos gênicos (*regulons*) fisiologicamente relacionados (NESVERA E PATEK, 2008).

**Figura 1 - Representação esquemática da holoenzima RNA polimerase no sítio inicial de transcrição.** A) A fita reconhecida de DNA está representada pela linha laranja. As cinco subunidades da holoenzima formam o cerne da RNA polimerase representada em verde, incluindo os domínios proteicos da subunidade  $\sigma$ , representada pela linha azul. Os domínios 2.4 e 4.2 da subunidade  $\sigma$  reconhecem respectivamente as sequências promotoras consenso -10 e -35. B) Etapas necessárias para a iniciação da transcrição pela RNAP. A holoenzima da RNAP se liga ao promotor para formar o complexo fechado, mudanças conformacionais abrem o complexo permitindo a ligação a região promotora consenso -10. Em seguida, a holoenzima inicia a produção de pequenas moléculas de RNA, dando origem ao complexo ternário. Após, o fator  $\sigma$  é dissociado e a RNAP sintetiza a molécula de RNA.





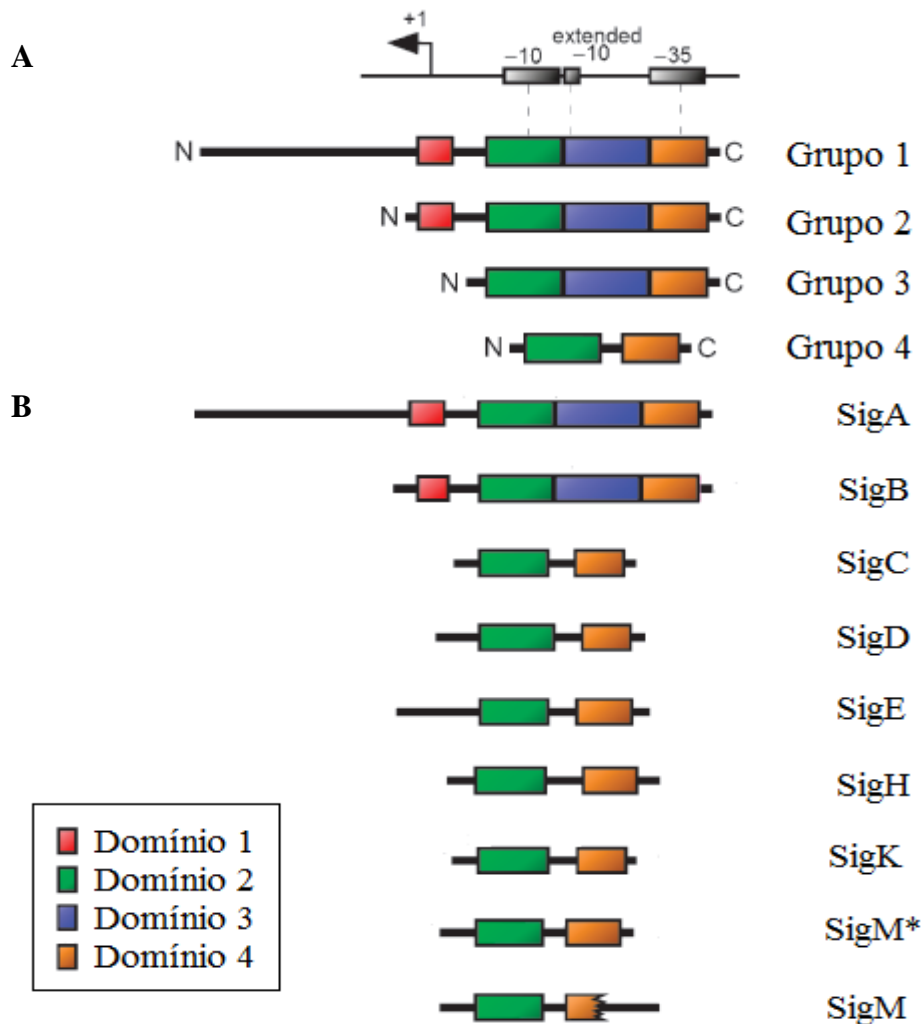
Fonte: Adaptado de Newton Foot e Gey Van Pittius (2013); Wösten (1998)

Com base na similaridade da sequência, os fatores  $\sigma$  bacterianos podem ser agrupados em duas famílias principais, a família sigma 70 ( $\sigma 70$ ) e família sigma 54 ( $\sigma 54$ ). A maioria dos fatores  $\sigma$  pertencem a família  $\sigma 70$ , chamado assim devido à similaridade com o fator  $\sigma$  primário de 70 kDa e o fator  $\sigma 54$  foi nomeado devido a sua similaridade com o fator  $\sigma$  de 54 kDa, responsável pela regulação do metabolismo do nitrogênio, ambos de *Escherichia coli* (WÖSTEN, 1998)

Os fatores dos tipo  $\sigma 54$  e  $\sigma 70$  são estruturalmente diferentes e utilizam um mecanismo distinto da formação do complexo aberto. Os fatores do tipo  $\sigma 54$  normalmente não são encontrados em bactérias gram-positivas com alto conteúdo G+C (KAZMIERCZAK et al., 2005; SACHDEVA et al., 2009). No entanto, todas as espécies bacterianas possuem pelo menos um fator do tipo  $\sigma 70$ , que estão relacionados com a transcrição da maioria dos genes constitutivos, genes essenciais ao crescimento exponencial em meio mínimo, sob condições ótimas de cultivo (genes *housekeeping*) (HALGASOVA et al., 2002).

Proteínas da família  $\sigma 70$  podem conter até quatro regiões conservadas, são subdivididas em quatro grupos de acordo com suas características estruturais e fisiológicas e dos domínios protéicos que possuem (Figura 2A). O grupo 1 é composto pelos fatores  $\sigma$  principais ou primários, os quais são essenciais para a viabilidade bacteriana e contém todas as regiões conservadas (domínios 1, 2, 3 e 4). O grupo 2 é composto por fatores  $\sigma$  intimamente relacionados aos fatores sigma primários, mas não são essenciais para a sobrevivência bacteriana. O grupo 3 não possuem o domínio 1 e estão relacionados a funções específicas como a esporulação e formação de flagelo. O grupo 4 inclui os fatores  $\sigma$  que contém apenas os domínios 2 e 4 e são denominados fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF) (Figura 2B) (GRUBER et al., 2003, SACHDEVA et al., 2009).

**Figura 2 - Representação esquemática de domínios conservados em fatores sigma da família  $\sigma 70$ .** A) O domínio 1 inibe fatores sigma que não estão associados ao do cerne da RNAP de se ligarem ao DNA. O domínio 2 é responsável por reconhecer a região promotora consenso -10, o domínio 3 reconhece sequências nas extensões da região promotora -10. Enquanto o domínio 4 reconhece sequências -35 de promotores gênicos. B) Arquitetura de domínios conservados dos fatores sigma de *Mycobacterium tuberculosis*. \* Existem algumas variações no domínio 4 do fator SigM.



Fonte: Adaptado de Rodrigue et al. (2006)

### 2.4.1 Fatores *sigma* alternativos de *C. pseudotuberculosis*

A exposição da bactéria a estímulos ambientais particulares pode alterar a transcrição gênica através de um mecanismo no qual a subunidade  $\sigma$  primária ligada ao cerne da RNA polimerase é substituída por um fator sigma alternativo, de modo a ativar a expressão de um conjunto específico de genes envolvidos na resposta adaptativa necessária (HELMANN, 2002; KAZMIERCZAK et al., 2005).

Os fatores  $\sigma$  alternativos estão estruturalmente relacionados à família  $\sigma 70$ , e podem ser agrupados em três classes distintas, dependendo do tipo de função que exercem: (i) a dos  $\sigma$  ativadores de mecanismos gerais de resposta a estresse, os quais apresentam grande similaridade estrutural com os fatores  $\sigma$  primários; (ii) a dos  $\sigma$  envolvidos principalmente nas alterações morfológicas do organismo, como formação de estruturas flagelares e esporulação; (iii) a dos fatores  $\sigma$  ECF (*Extracitoplasmic function*), os quais estão envolvidos na ativação de mecanismos de adaptação às mudanças no periplasma, na membrana da bactéria e no ambiente extracelular (KAZMIERCZAK et al., 2005; POTVIN et al., 2008).

Após a finalização do Projeto Genoma de *C. pseudotuberculosis* pela Rede Genoma de Minas Gerais e Rede Paraense de Genômica e Proteômica foi possível a identificação de sete fatores *sigma* alternativos nesta bactéria: o fator *sigma* B de resposta geral ao estresse e os fatores *sigma* C, D, E, H, K e M de função extracitoplasmática. Estes fatores foram identificados através da análise do genoma de *C. pseudotuberculosis*, utilizando as ferramentas bioinformáticas disponíveis no banco MiST2 (*Microbial Signal Transduction database*) (PACHECO, 2010).

### 2.4.2 Fatores *sigma* de função extracitoplasmática (ECF)

Os fatores  $\sigma$  ECF se destacam dentre os fatores  $\sigma$  alternativos da família  $\sigma 70$  por controlarem processos que são importantes para a infecção, frequentemente ativam a transcrição de genes envolvidos em processos relacionados ao envelope celular bacteriano, incluindo secreção, síntese de exopolissacarídeos, influxo/efluxo de ferro, e síntese de proteases extracelulares (HELMANN, 2002; BASHYAM E HASNAI, 2004; JORDAN et al., 2008).



A transcrição de cada gene codificador de fator  $\sigma$ ECF pode ser regulada pelo próprio fator  $\sigma$  que está sendo produzido ou por um ou mais fatores  $\sigma$  distintos (HELMANN, 2002). Geralmente os fatores  $\sigma$  são co-transcritos com seus respectivos ligantes anti-sigma, os quais atuam como reguladores negativos. Os fatores anti-sigma se desligam dos fatores  $\sigma$  na presença de sinais específicos de mudança no ambiente extracelular. Os mais comuns se tratam de proteínas transmembranas, com um domínio sensorial extracitoplasmático e um domínio intracelular inibitório (RAIVIO et al., 2001; YOSHIMURA et al., 2004; NESVERA E PÁTEK, 2008).

Análises comparativas entre sequências genômicas bacterianas, que estavam disponíveis em bancos de dados, revelaram uma grande variação no número de genes de fatores  $\sigma$  ECF entre diversos microrganismos, *E. coli* possui 2 genes codificadores de fatores  $\sigma$  ECF, *Bacillus subtilis* 7 genes, *Mycobacterium tuberculosis* 10 genes, *M. leprae* 2 genes e *Streptomyces coelicolor* possui 50 genes (HELMANN, 2002).

#### **2.4.3 Envolvimento de fatores sigma na virulência bacteriana**

Os fatores  $\sigma$  alternativos regulam a expressão tanto de genes de virulência, os quais codificam proteínas cujas funções são essenciais para que a bactéria estabeleça efetivamente uma infecção no organismo hospedeiro, quanto de genes associados a virulência, os quais podem contribuir para a sobrevivência do patógeno no meio ambiente ou para a sua sobrevivência dentro do hospedeiro. Além disso, os fatores  $\sigma$  alternativos podem regular a expressão de outros fatores  $\sigma$  ou de outros reguladores transcricionais, os quais, por sua vez, regulam a expressão de genes de virulência e de genes associados a virulência. (BASHYAM E HASNAIN, 2004; KAZMIERCZAK et al., 2005).

A *C. pseudotuberculosis* possui um fator sigma (*sigA*) homólogo ao fator sigma primário  $\sigma^{70}$  de *E. coli*, portanto este provavelmente deve ser o fator responsável pela ativação de genes constitutivos em *C. pseudotuberculosis*. Porém, Castro (2009) ao realizar estudo da expressão gênica dos fatores sigma aplicando estresse oxidativo proveniente do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), observou um aumento na expressão do *sigA* no início da fase exponencial após 15 minutos de exposição ao estresse. Provavelmente o *sigA* esteja exercendo também sua função de fator sigma alternativo. Um estudo de Taylor (1984) em *E. coli* sugeriu que o fator sigma primário poderia reconhecer genes envolvidos na resposta ao estresse.

O fator sigB está relacionado a mecanismos gerais de resposta a estresse. (KAZMIERCZAK et al., 2005). Rodrigue e colaboradores (2006) demonstraram que a deleção de sigB em *M. tuberculosis* resultou em uma maior sensibilidade ao choque térmico, ao estresse oxidativo, a exposição à vancomicina e condições de hipóxias. Através da técnica de RNA-seq em um estudo de transcriptoma foi observado que o fator  $\sigma$ B de *C. pseudotuberculosis* 1002 teve sua expressão aumentada frente ao estresse ácido, sendo altamente induzido, com uma razão de expressão três vezes maior que no controle (PINTO et al., 2011)

No trabalho de Domingueti (2011), através do emprego de plasmídeo suicida, foi possível avaliar a diferença no crescimento e viabilidade da linhagem de *C. pseudotuberculosis* 1002 mutante para sigC e selvagem frente a diferentes estresses. Os resultados mostraram que a linhagem mutante foi mais sensível aos estresses oxidativo, osmótico e térmico que a selvagem indicando que o fator  $\sigma$ C, possivelmente, desempenha importante papel na sobrevivência da bactéria nesses ambientes.

O gene sigD em *Mycobacterium tuberculosis* é expresso em um nível moderadamente alto e constitutivo durante as fases de crescimento exponencial e estacionária e diminui significativamente, após hipóxia, em um padrão muito semelhante ao fator sigA em uma cultura *in vitro* (RAMAN et al., 2004; HU E COATES, 2001). Em *Escherichia coli* este gene é modulado pelo produto do gene *relA* (MAGNUSSON et al., 2005). Deleções deste gene *relA* em *M. tuberculosis* mostraram uma perda da virulência desta bactéria, associado com uma diminuição significativa na expressão do sigD durante a fase exponencial (DAHL et al., 2003).

A linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* mutante para o gene sigD mostrou uma perda moderada na virulência desta bactéria, com menos alterações histopatológicas em camundongos (BALB/c) (RAMAN et al., 2004). Enquanto a mutação no sigD da linhagem CDC1551 de *M. tuberculosis* resultou em atenuação significativa da letalidade em um modelo de infecção em murinos, indicando que a perda de SigD não tem um efeito detectável sobre a capacidade de *M. tuberculosis* a sofrer fagocitose de macrófagos e sobrevivência dentro de fagossomas (CALAMITA et al., 2005).

A *Pseudomonas aeruginosa* possui um fator homólogo ao sigE, este é um importante fator envolvido na virulência deste microrganismo (gene *algU/algT*), o qual regula a expressão dos genes de resposta aos estresses oxidativo e térmico, (POTVIN et al., 2008). Similarmente, os fatores sigE de *M. tuberculosis* também regulam a expressão de genes que proporcionam resistência ao estresse oxidativo, auxiliando na sobrevivência da bactéria dentro de macrófagos e ao estresse térmico (MANGANELLI et al., 2001; KAZMIERCZAK et al., 2005).

Em *C. pseudotuberculosis*, estudos recentes realizado por Pacheco e colaboradores (2012), demonstraram que o fator sigma alternativo  $\sigma E$  desempenha um papel essencial na resistência desta bactéria à condições de estresse encontradas no ambiente intrafagossômico. Em particular, a deficiência do gene *sigE* de uma linhagem mutante levou à maior sensibilidade a concentrações fisiológicas de estresse nitrosativo destacando a sua importância na resposta adaptativa de *C. pseudotuberculosis*.

Através da produção de uma linhagem de *M. tuberculosis* mutante para o fator sigH, foi observado que esta se tornou mais sensível aos estresses térmico e oxidativo (MANGANELLI et al., 2002). Esta linhagem também se mostrou significativamente atenuada em relação a linhagem selvagem em modelo murino, apesar de ser capaz de sobreviver e de proliferar no interior de macrófagos, o que indica que este fator *sigma* é importante para a virulência da bactéria (KAUSHAL et al., 2002). Através de estudos de microarranjo, foi verificado que o fator  $\sigma H$  regula a transcrição de proteínas do choque térmico. Além disso, o fator  $\sigma H$  regula sua própria expressão e a expressão dos fatores  $\sigma B$  e  $\sigma E$  (MANGANELLI et al., 2002).

O fator sigK, que também apresenta função extracitoplasmática, é conhecido pelo seu importante papel na transcrição de genes codificadores de proteínas imunogênicas. Linhagens atenuadas do Bacilo Calmette-Guerin (BCG) de *M. bovis*, conhecidas por vacina BCG, apresentam uma mutação no códon iniciador do gene *sigK*, a qual está relacionada à fraca expressão deste gene e, como consequência, à virulência reduzida da bactéria, sendo estas linhagens utilizadas na vacinação contra tuberculose (CHARLET et al., 2005). A *C. glutamicum*, bactéria não patogênica de interesse biotecnológico, não possui o fator  $\sigma K$ , sugerindo que este pode estar envolvido em algum mecanismo de virulência em *C. pseudotuberculosis*.

Castro (2009) em seu trabalho com *C. pseudotuberculosis* 1002 observou um aumento de expressão do gene *sigM*, que codifica o fator  $\sigma_M$ , somente após 270 min de aplicação do estresse oxidativo. Em *C. glutamicum* experimentos revelaram que uma deleção do *sigM* causou redução na viabilidade celular diante da aplicação do estresse por choque térmico e dissulfeto (subtipo do estresse oxidativo) na cultura em fase de crescimento exponencial. Além disso, experimentos com PCR em tempo real demonstraram que a transcrição de *sigM* aumentou significativamente depois da aplicação destes estresses. Estes resultados sugerem que este fator está envolvido na resposta ao estresse (NAKUNST et al., 2007), contudo, há um forte indício de que seja em fase mais tardia de crescimento. De forma similar, com relação ao fator sigma K, Castro (2009) somente detectou forte indução deste gene de *C. pseudotuberculosis* após 270 min de exposição ao peróxido de hidrogênio.

Recentemente, Pando e colaboradores (2010) demonstraram que uma linhagem de *Mycobacterium tuberculosis* mutante para o gene *sigE* ( $\Delta sigE$ ) foi capaz de causar imunogenicidade e conferir proteção a tuberculose pulmonar progressiva em camundongos (BALB/c). Esse estudo mostrou que esta linhagem  $\Delta sigE$  pode ter um forte potencial como uma vacina atenuada, uma vez que a resposta imunológica à sua infecção é muito semelhante a de uma infecção natural, comprovando sua melhor eficiência com relação à vacina BCG utilizada atualmente. O qual gerou uma patente depositada (SMITH et al., 2013)

## **2.5 Análise de expressão gênica diferencial**

### **2.5.1 Genes de referência (genes *housekeeping*) como normalizadores endógenos**

A PCR quantitativa em tempo real posterior à transcrição reversa (RT-qPCR) é uma das técnicas de biologia molecular amplamente utilizadas para a validação dos dados de expressão gênica, pois apresenta sensibilidade e especificidade na análise de transcritos. Esta tecnologia está fundamentada na reação em cadeia da DNA-polimerase com agentes fluorescente intercalantes de nucleotídeos dos *amplicons* sintetizados. Os produtos formados são monitorados a cada ciclo, o que permite uma detecção rápida e precisa do cDNA amplificado (GACHON et al., 2004).

Apesar disso, esta técnica necessita de uma uniformização para a correta interpretação dos dados obtidos. A padronização requer comparação com um ou mais genes que são

considerados controle endógeno, cuja expressão se mantém relativamente estável em diferentes estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas (CZECHOWSKI et al., 2005; GUÉNIN et al., 2009). Os genes que são constitutivamente expressos em vários estímulos ambientais são cruciais para quantificar os genes diferencialmente expressos. Estes genes constitutivos “*housekeeping*” são chamados de normalizadores na técnica de RT-qPCR e são empregados como fator de normalização para a análise da expressão dos genes de interesse (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

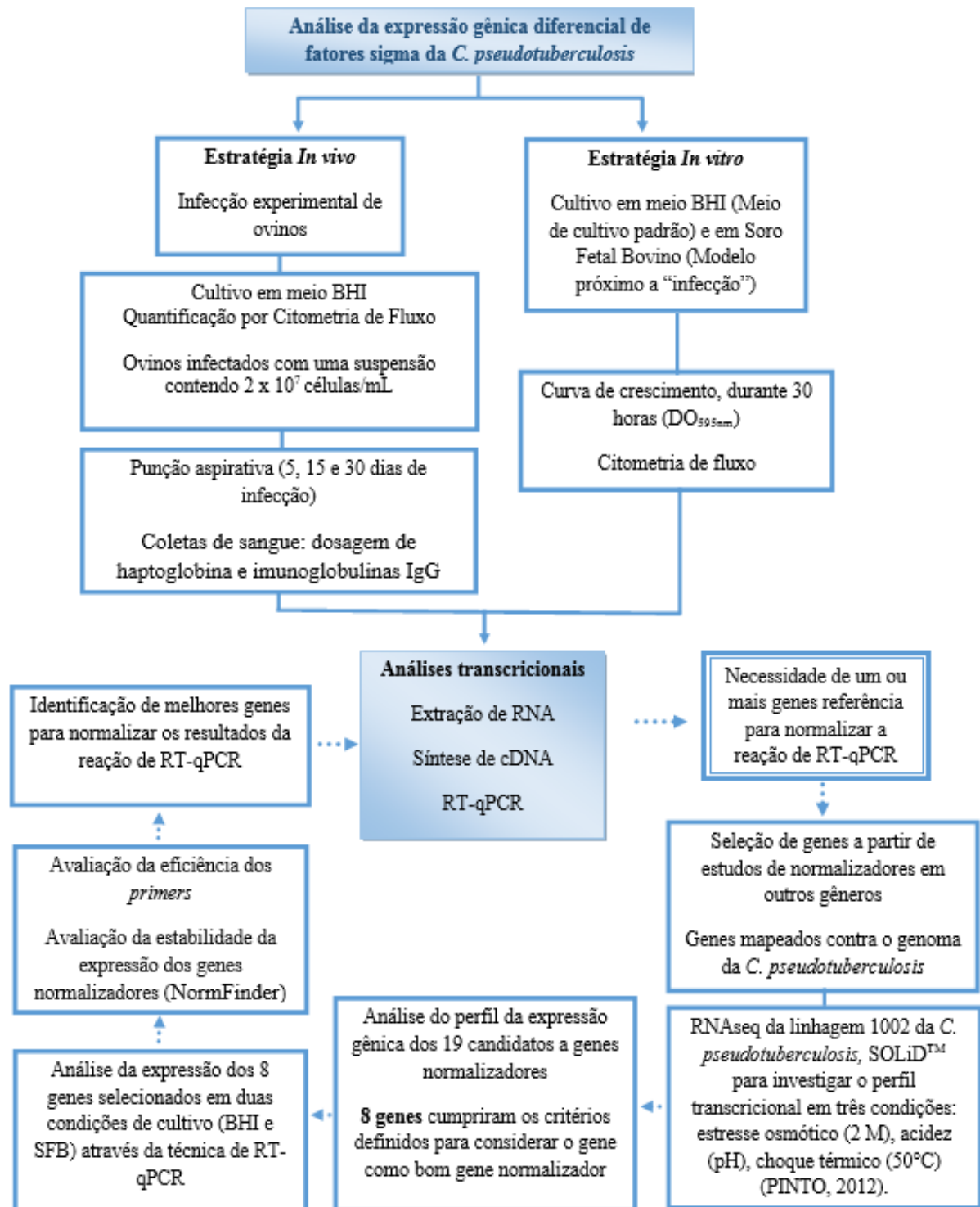
O principal objetivo deste projeto foi avaliar a expressão gênica diferencial dos fatores sigma alternativos da bactéria patogênica *Corynebacterium pseudotuberculosis* em condições que mimetizam o crescimento na presença de fatores do hospedeiro. Para tal, diversos objetivos específicos foram definidos, os quais são apresentados a seguir.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 1) Identificar normalizadores com expressão estável para estudos de expressão gênica por qRT-PCR em *C. pseudotuberculosis*;
- 2) Realizar culturas de *C. pseudotuberculosis* em meio padrão e meio que mimetiza o crescimento no hospedeiro;
- 3) Realizar extração de RNA bacteriano à partir de amostras de culturas;
- 4) Infectar ovinos experimentalmente com uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* e realizar coletas de material clínico em intervalos determinados de tempo;
- 5) Realizar extração de RNA bacteriano à partir de amostras clínicas, obtidas por punção aspirativa dos linfonodos de animais infectados;
- 6) Realizar reações de PCR em tempo real para análise da expressão gênica diferencial de todos os fatores sigma alternativos de *C. pseudotuberculosis*;
- 7) Avaliar a regulação diferencial dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* em todos os intervalos da infecção experimental;
- 8) Identificar, através de análises *in silico*, genes provavelmente regulados por fatores sigma que apresentarem expressão aumentada durante estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenho experimental



## 4.2 Equipamentos utilizados

- Agitador tipo *vortex* (Scientific Industries)
- Analisador de amostras “NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- Autoclave (Phoenix)
- Balança eletrônica (Shimadzu)
- Capela de exaustão química (Permutation®)
- Centrífuga “5417C” (Eppendorf)
- Destilador de água “Direct-Q® 3” (Millipore™)
- Espectrofotômetro “BioPhotometer Plus” (Eppendorf)
- Estufa incubadora (Nova Ética)
- Freezer -20°C (Electrolux)
- Freezer -80°C (Sanyo)
- Geladeira (Brastemp)
- Homogeneizador de amostras “Precellys 24” (Bertin Technologies)
- Incubadora do tipo *shaker* (Nova ética)
- Micropipetas
- NanoDrop 1000
- Termociclador
- Termociclador 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)
- Termociclador 17K Flex Real-Time PCR System (QuantStudio™)

## 4.3 Reagentes utilizados

- 2-mercaptoetanol (2-ME, Sigma Aldrich®)
- Água mili-Q esterilizada em autoclave
- Etanol (Synth®)

## 4.4 Kits de biologia molecular

- First - Strand cDNA Synthesis kit for Real - Time PCR (Usb™)
- Iscript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)
- iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio- Rad)
- Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™)

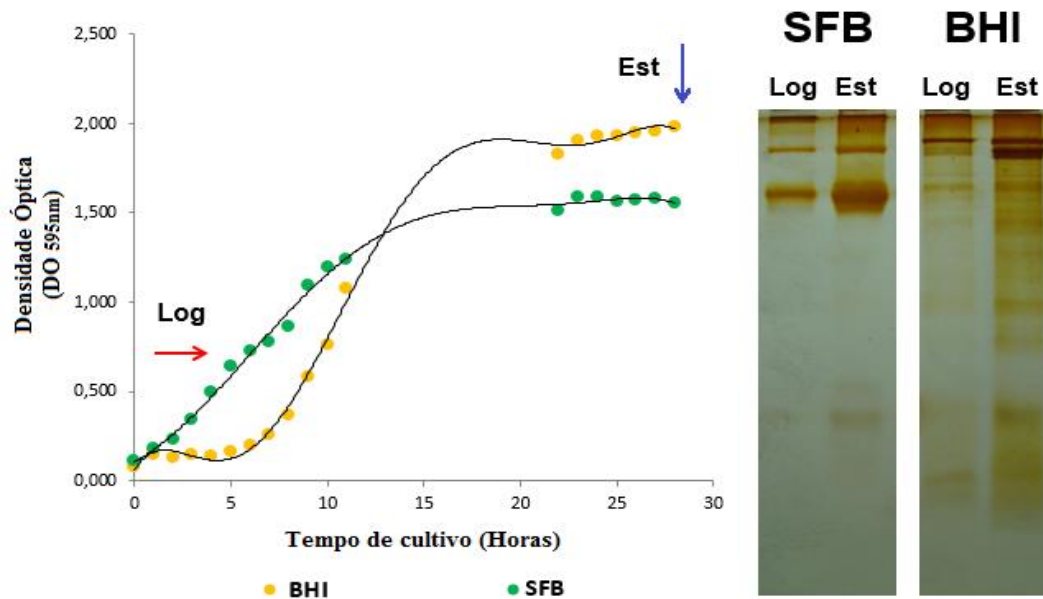


- RNA isolation, NucleoSpin® RNA (Macherey – Nagel)
- RNeasy® Mini Kit (Qiagen™)

#### 4.5 Cultivo bacteriano e avaliação do crescimento através de Densidade Óptica e Citometria de fluxo

Uma linhagem virulenta de *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi regularmente cultivada em caldo infusão cérebro coração (BHI), a 37°C e sob agitação de 140rpm (rotações por minuto) em incubadora tipo Shaker. Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo com a deposição de uma alíquota de 200µL do estoque bacteriano (mantido a -80°C) em 5 mL de BHI caldo. Após 16-18 horas de crescimento a cultura foi subdividida em dois meios diferentes, 100µL do cultivo foi reinoculado em 9,9 ml de caldo BHI e em 9,9 ml de Soro Fetal Bovino (SFB). Um protocolo utilizado por Bastos et al. (2013) (Dados não publicados) identificou através de ensaios de *Western Blot* frações proteicas da *C. pseudotuberculosis* crescida em SFB que apresentavam reatividade a anticorpos de ovinos soropositivos, as quais não foram observadas no meio BHI, sugerindo assim que a bactéria crescida em SFB apresenta um perfil de expressão proteica mais semelhante ao encontrado durante a infecção (Figura 3).

**Figura 3 - Linhagem bacteriana cultivada em caldo BHI e SFB para ensaios de Western Blot com a fração proteica F3.** Massas bacterianas foram obtidas durante as fases Log e estacionária da curva de crescimento da bactéria, representados pelas setas vermelha e azul, respectivamente, para extração da fração proteica e identificação de moléculas que apresentem reatividade a anticorpos de ovinos soropositivos.

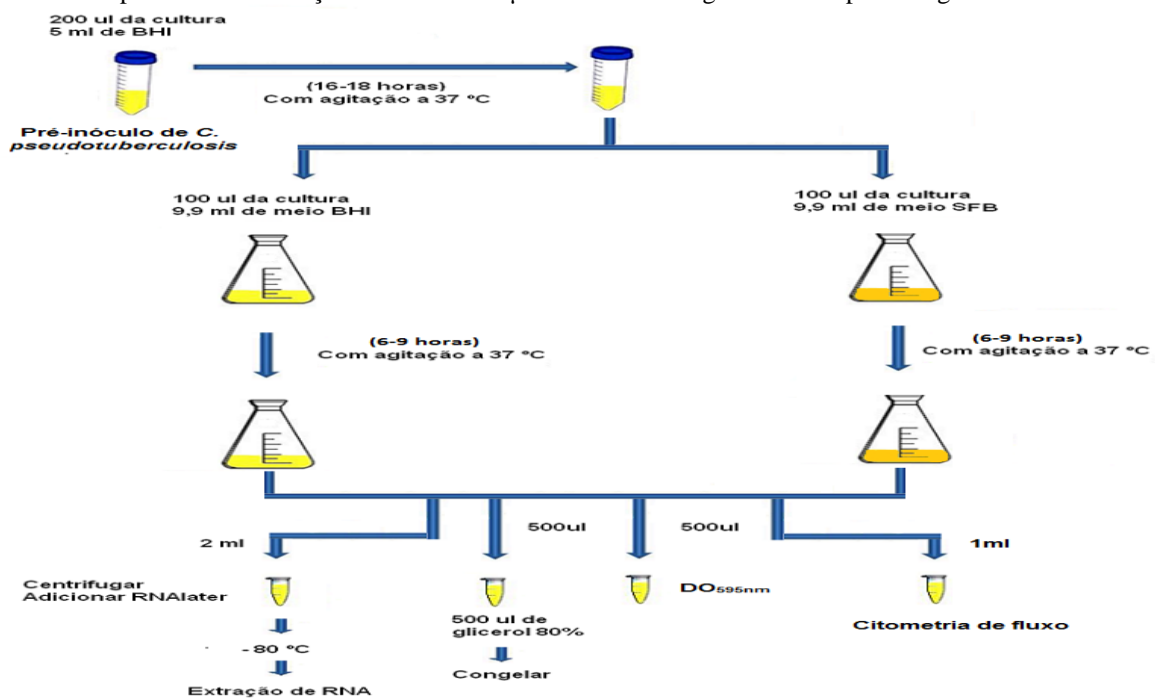


Fonte: Adaptado de Bastos et al.(Dados não publicados)

Foram realizadas curvas de crescimento bacteriano nos dois meios, em intervalos regulares de tempo, 500µL da cultura, em triplicatas, foram submetidos à leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 595nm, utilizando o equipamento “BioPhotometer Plus” (Eppendorf) e quantificação bacteriana por citometria de fluxo.

As culturas foram constantemente monitoradas até atingirem a  $DO_{595nm}$  de 0,7, com aproximadamente 6-9 horas de crescimento, neste ponto foram retiradas alíquotas de 2ml das culturas para realizar a extração de RNA e 500µL adicionado de glicerol 80% para congelar e armazenar, como mostra a Figura 4.

**Figura 4 - Representação esquemática da etapa inicial de curva de crescimento nos dois meios de cultura, BHI e SFB para avaliação da expressão diferencial dos fatores sigma alternativos:** Foi preparado um pré-inóculo com deposição de 200µL de um estoque bacteriano em 5ml de BHI, após 16-18 horas de crescimento 100µL do cultivo foi reinoculado em dois tubos com 9,9 ml de meio BHI e SFB. O monitoramento e contagens bacterianas foram realizados por citometria de fluxo e monitoramento da  $DO_{595nm}$  por espectrofotômetro até atingirem 0,7, neste ponto (com aproximadamente 6-9 horas de crescimento) foram retiradas alíquotas de 2ml das culturas para realizar extração de RNA e 500µL adicionado de glicerol 80% para congelar e armazenar.



#### 4.5.1 Citometria de fluxo

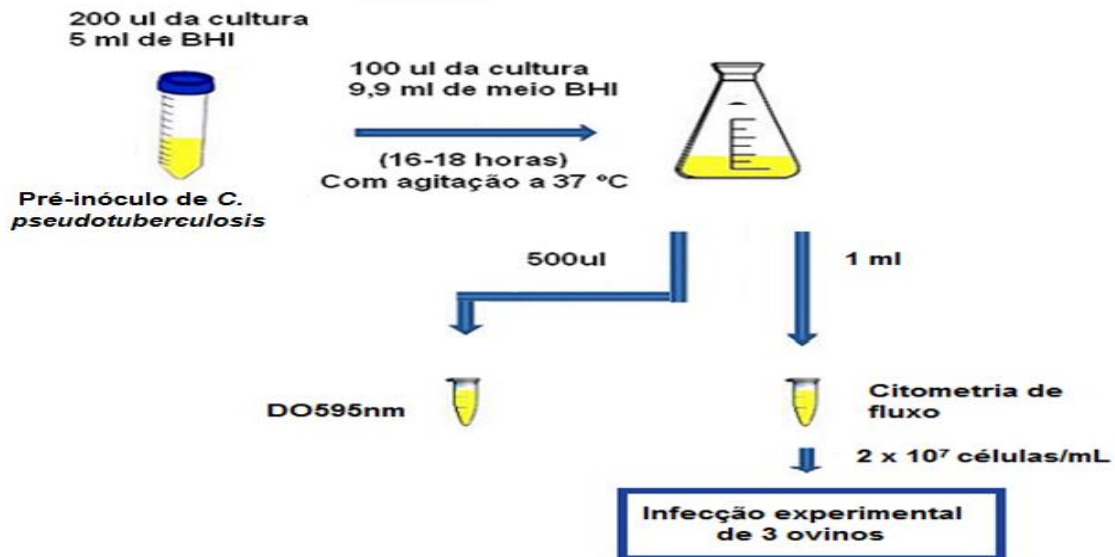
Foram retiradas 1mL de cada cultura, BHI e SFB, para quantificação por citometria de fluxo, como descrito por (SAMPAIO, 2012). As bactérias foram lavadas (solução salina 0,9%) e centrifugadas a 8.000g por 4 minutos, após o sobrenadante foi desprezado, acrescentou-se o SYBR Safe™ (corante que intercala a fita dupla de DNA), incubou-se por 20 minutos no

escuro, à temperatura ambiente. Depois da incubação procedeu-se outra lavagem para retirada do excesso dos reagentes, e o pellet bacteriano foi ressuspense para mensuração pelo citômetro de fluxo.

#### 4.6 Infecção experimental de ovinos com *C. pseudotuberculosis* e coleta de amostras clínicas

Uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* foi regularmente cultivada em BHI, como descrito no item 4.5. A cultura foi submetida a contagem por citometria de fluxo, como descrito no item 4.5.1, e apresentavam uma densidade de  $2 \times 10^7$  células/mL. Com essas alíquotas grupo de três ovinos, mantidos sob condições controladas, foram infectados experimentalmente (Figura 5).

**Figura 5 - Representação esquemática da etapa inicial de curva de crescimento no meio de cultura BHI, para infecção experimental de grupo de três ovinos:** Foi preparado um pré-inóculo com deposição de 200ul de um estoque bacteriano em 5ml de BHI, após 16-18 horas de crescimento 100µL do cultivo foi reinoculado em 9,9 ml de meio BHI. O monitoramento e contagens bacterianas foram realizados por monitoramento da DO<sub>590nm</sub> por espectrofotômetro e contagem por citometria de fluxo até atingirem  $2 \times 10^7$  células/mL, neste ponto foram retiradas alíquotas de 1ml das culturas para realizar a infecção.



Os ovinos selecionados foi baseado em alguns critérios, incluindo a condição corporal, ausência de abscessos linfático ou aumentado destes a palpação. Nenhum ovino apresentou sinais clínicos de LC e todos eram soronegativos em um ensaio ELISA indireto, no início do estudo. Após, grupo de três ovinos foram infectados experimentalmente com uma suspensão contendo  $2 \times 10^7$  células/mL com seringas estéreis. Este experimento foi conduzido sob a autoridade da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 (declarações sobre o uso de animais em experimentos de pesquisa), após aprovação pela Secretaria de Saúde Animal do Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Todas as inoculações foram realizadas por via subcutânea em regiões próximas ao linfonodo cervical superficial e ao linfonodo pré-femoral superficial, em quatro pontos, cervical direito e esquerdo e pré-femoral direito e esquerdo. Em intervalos determinados de tempo foram realizadas três punções aspirativas nos linfonodos dos animais, como descrito por Ribeiro e colaboradores (2001), 5 dias, 15 dias e 30 dias após a infecção, a punção aspirativa foi realizada no linfonodo cervical superficial, pois era o linfonodo que apresentava maior tamanho (Figura 6). Imediatamente após a coleta, as amostras foram imersas em solução estabilizadora de RNA. Os tubos com esta mistura foram incubados à temperatura ambiente para a estabilização da atividade transcricional e a conservação da integridade do RNA. Depois, as amostras foram armazenadas em freezer - 80°C até o procedimento de extração do RNA total.

**Figura 6 - Punção aspirativa, que foi realizada no linfonodo cervical superficial direito.** (A), (B) e (C) correspondem aos animais I, II, e III respectivamente.



#### 4.7 Acompanhamento da infecção

Foram realizadas coletas de sangue dos animais, na veia jugular, nos tempos 5, 15 e 30 dias, para acompanhar a progressão da infecção através da dosagem de haptoglobina, que é uma proteína marcadora de fase aguda e dosagem da imunoglobulina IgG. Após 5 dias da infecção

os linfonodos superficiais cervicais já se apresentavam aumentados de tamanho. No tempo de 30 dias os linfonodos apresentavam linfomegalia, mas não apresentavam lesão purulenta.

#### **4.7.1 Dosagem de IgG-anti *C. pseudotuberculosis***

O ELISA indireto foi realizado para dosagem de IgG-anti *C. pseudotuberculosis*, a placa foi sensibilizada com 100 µL do antígeno do sobrenadante diluído em tampão Carbonato Bicarbonato 0,5M, durante 12 horas em câmara úmida a 4°C, a solução de sensibilização foi descartada e a placa lavada com tampão de lavagem (PBS – 0,05% de tween 20). O bloqueio da placa foi realizado com a proteína do leite desnatado, incubado por 2 horas a 37°C, a solução de bloqueio foi descartada e a placa lavada com solução de lavagem, 50µL do soro de cada animal, em triplicata, diluído 1:100 em PBS- 0,05% tween 20 foi adicionado a placa e incubado a 37°C por 1 hora. Após o soro ser descartado e a placa lavada, 50 µL do conjugado anti-IgG de ovino marcado com peroxidase, diluído seguindo recomendações do fabricante, foi adicionado a placa, após removido e adicionado 50 µL da solução reveladora (25 mL de tampão cítrico-fosfato + TMB 10mg + 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%), incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, por fim a reação da solução reveladora foi interrompida com 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Após, a leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada em leitor de microplacas com DO<sub>490nm</sub>.

#### **4.7.2 Dosagem de Haptoglobina (Hp)**

A concentração da haptoglobina (Hp) sérica foi avaliada com base na sua capacidade em se ligar a moléculas de hemoglobina (Hb). Com a adição do guaiacol no teste, o qual se liga ao complexo Hp-Hb, e na presença do peróxido de hidrogênio todos os complexos presentes se coram permitindo assim a determinação da haptoglobina complexada, onde o branco da amostra determinará a presença de hemoglobina livre, evitando um possível erro de hemólise no teste. A intensidade de coloração será diretamente proporcional à quantidade de haptoglobina complexada na amostra teste. Utilizou-se uma solução padrão de haptoglobina para elaboração da curva padrão. 10µL das amostras de soro foram diluídas em 90µL solução fisiológica, sendo adicionados 50µL de solução de hemoglobina nos poços testes e 50µL de solução fisiológica nos poços brancos. Após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 150µL do substrato guaiacol e 50µL de peróxido de hidrogênio.

Após 5 minutos, a leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada em leitor de microplacas em comprimento de onda de 492nm.

## **4.8 Análises transcricionais**

### **4.8.1 Amostragem utilizada para obtenção de RNA total**

Para a obtenção do RNA total de *C. pseudotuberculosis* das culturas, foram isoladas alíquotas de 3 culturas do SFB, da mesma forma o RNA total foi extraído das três culturas controle do BHI. Alíquotas de 1ml das culturas foram retiradas dos frascos. A obtenção do RNA total de *C. pseudotuberculosis* da punção aspirativa dos linfonodos dos ovinos foi feita a partir de frações de 1g da amostra clínica coletada. O reagente RNAlater® (LifeTechnologies) foi previamente misturado às amostras, nos tempos determinados, para a estabilização da atividade transcricional e conservação da integridade do RNA.

As etapas descritas a seguir foram realizadas da mesma forma para todas as amostras, cultura em BHI e SFB e para as amostras de punção aspirativa.

### **4.8.2 Extração de RNA Total**

Para a extração do RNA total de *C. pseudotuberculosis*, os procedimentos adotados foram realizados utilizando materiais dedicados exclusivamente a esta finalidade. Os acessórios vítreos foram previamente incubados a temperatura de 250°C por 4h, em estufa de esterilização, para a inativação de eventuais RNases contaminantes. Ponteiras plásticas livres de RNase e contendo filtros foram autoclavadas e utilizadas para as pipetagens, e o restante dos materiais plásticos empregados foram tratados por imersão em solução de dietilpirocarbonato (DEPC) 0,01%, a 37°C e durante 12h. As superfícies das bancadas do laboratório, as micropipetas e os demais equipamentos utilizados foram previamente higienizados com o auxílio da solução em aerosol RNase Exterminator (BioAgency).

As amostras foram submetidas à extração de RNA total com utilização de dois kits “RNeasy® Mini Kit” e “RNA isolation NucleoSpin®”, sendo seguidas as recomendações do fabricante com adaptações nos procedimentos. Após descongelamento em gelo, os precipitados foram ressuspensos em 500 µL de “RLT buffer” (Qiagen™) e transferidos para tubos de 2 mL parcialmente preenchidos por microesferas de vidro de 1 mm de diâmetro (Bertin

Technologies). A lise mecânica das células foi feita no homogeneizador “Precellys 24” configurado para agitar os tubos a 6.500 rpm por 2 ciclos de 15 s, com intervalo de 5 s. As amostras foram centrifugadas por 1 min e o sobrenadante foi transferido para as colunas “RNeasy Mini spin column”. As colunas foram submetidas aos processos descritos no manual do “RNeasy® Mini Kit”. Quando indicado, foram acrescentados a cada coluna 130 µL de solução “DNase I incubation Mix”, para a eliminação de DNA genômico residual. A eluição do RNA total retido na membrana das colunas foi feita duas vezes com 40 µL de água mili-Q RNase-Free. As alíquotas de RNA total obtidas foram quantificadas em equipamento “NanoDrop 1000” e as amostras foram armazenadas a -80°C até sua utilização.

#### **4.8.3 Síntese de cDNA**

As amostras de RNA total extraídas foram submetidas à reação de transcrição reversa na qual foi empregado os *kits* “First-strand cDNA synthesis kit” USB e “Iscrip cDNA Synthesis Kit” Bio-Rad dotados de oligonucleotídeos de sequências aleatórias para a obtenção das fitas de DNA complementar (cDNA) às fitas simples de RNA. As reações foram realizadas com o auxílio de um termociclador, programado de acordo com as recomendações do fabricante. Para a realização destas reações foram utilizadas as mesmas quantidades de RNA total das alíquotas provenientes das três replicas biológicas. Os cDNAs gerados foram mantidos a -80°C até a sua utilização para realização da RT-PCR.

#### **4.8.4 PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)**

Amostras de cDNA obtidas através da técnica de transcrição reversa foram submetidas a amplificação por RT-qPCR com o uso dos pares de iniciadores listados na Tabela 1. O equipamento ABI 7500HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) foi empregado para as reações de qPCR em conjunto com o aplicativo SDS 2.4 (Applied Biosystems™), o qual permite acompanhar em tempo real as amplificações dos fragmentos de DNA, utilizando a fluorescência emitida pelo reagente SYBR® Green.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados no ensaio de RT-qPCR

<b>Gene-</b>	<b>Descrição</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Sequência<sup>a</sup></b>
<i>sigA</i>	Fator sigma primário SigA	RTsigA_F	5'- GTGAGCTGCTCCAGGATTTG-3'
		RTsigA_R	5'- CGCGCATATTGTTGGATCTC-3'
<i>sigB</i>	Fator sigma alternativo SigB	RTsigB2_F	5'- TGAAGACTCCGAAGCAACC-3'
		RTsigB2_R	5'- CGTCGCTCAAGTGTATCCAG-3'
<i>sigC</i>	Fator sigma alternativo de função extracitoplasmática SigC	RTsigC_F	5'- ACCTGGTCCGACTGGATTG-3'
		RTsigC_R	5'- GAGCACTTGCGTCAGAATGAG-3'
<i>sigD</i>	Fator sigma alternativo de função extracitoplasmática SigD	RTsigD2_F	5'- TTGTGTATGGCATCGCTTC-3'
		RTsigD2_R	5'- CGGTTTCTGGAACGTCTTC-3'
<i>sigE</i>	Fator sigma alternativo de função extracitoplasmática SigE	RTsigE_F	5'- CTTTCACCCAGCTCAAGCC-3'
		RTsigE_R	5'- TCGATCCGATACCAGCGTC-3'
<i>sigH</i>	Fator sigma alternativo de função extracitoplasmática SigH	RTsigH_F	5'- GAATTGGCGTGAGCGAAAC-3'
		RTsigH_R	5'- GATCCCAGCGGCTATATCC-3'
<i>sigK</i>	Fator sigma alternativo de função extracitoplasmática SigK	RTsigK2_F	5'- GTCATGCTGGCTTATTTCTCC-3'
		RTsigK2_R	5'- GGTTTTGGCAGTACCAAGG-3'
<i>sigM</i>	Fator sigma alternativo de função extracitoplasmática SigM	RTsigM2_F	5'- AACGACACCGCAACACTATG-3'
		RTsigM2_R	5'- GGTCTTTGAGCGACACAGC-3'

<sup>a</sup> Referência: **Castro, (2009)**

Os parâmetros do termociclador “7500 Real-Time PCR System” e quantidade dos reagentes utilizados na amplificação, estão descritos na Tabela 2 e na Tabela 3, respectivamente.

**Tabela 2** - Parâmetros selecionados no termociclador para o processamento das reações de RT-qPCR.

<b>Etapas da reação de qPCR</b>	<b>Subetapas da reação de qPCR</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Desnaturação inicial	-	95 °C	10 min
	Desnaturação	95 °C	15 s
Estágio cíclico (45 repetições)	Anelamento e extensão de iniciadores	60 °C	1 min
	Desnaturação	95 °C	15 s



Análise de dissociação contínua <sup>1</sup>	Renaturação	60 °C	15 s
	Desnaturação	95 °C	15 s

1.A etapa de análise de dissociação contínua foi realizada para confirmação da presença de produtos amplificados específicos nas reações de qPCR.

**Tabela 3 - Reagentes e suas quantidades utilizadas nas reações de RT-qPCR.**

Reagente	Concentração do estoque	Concentração de trabalho	Concentração final na reação	Volume por reação
Master Mix (Applied Biosystems)	2X	2X	1X	7,5 µL
Iniciador senso	100 pmol/ µL	2,5 pmol/ µL	2,5 pmol/ µL	1,0 µL
Iniciador antisenso	100 pmol/ µL	2,5 pmol/ µL	2,5 pmol/ µL	1,0 µL
Amostra de cDNA	Resultante da transcrição reversa	Estoque diluído 5X	-	1,0 µL (ausente para N.T.C. <sup>1</sup> )
H2O mili-Q estéril	-	-	-	q.s.p. 15 µL

1. Reações N.T.C. foram realizadas para verificação de ausência de amplificação quando a amostra de cDNA é substituída por amostra de RNA.

#### 4.8.5 Identificação de genes normalizadores

Foram selecionados vinte e cinco genes housekeeping, como possíveis candidatos a genes normalizadores, a partir da literatura publicada em estudos de genes normalizadores em outros organismos, sete desses genes, *atpA*, *dnaE*, *dnaG*, *dnaK*, *fusA*, *leuA* e *odhA*, foram identificados por comparação de sequências do genoma de *Corynebacterium diphtheriae*, *C. glutamicum* e *C. efficiens* (BOLT et al., 2010). Adékambi e colaboradores (2011) identificaram cinco genes, *ychF*, *rpoB*, *rpoC*, *secY*, *infB* pela análise do genoma de várias espécies da subclasse *Actinobacteridae*. Onze genes, *adk*, *pgi*, *pncA*, *glyS*, *efp*, *gltS*, *gyrA*, *katG*, *gyrB*, *hsp65*, *sodA* foram identificados através do sequenciamento dos genomas de cinco estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* (SUPPLY et al., 2013). Outros dois genes foram adicionados a análise, o *sigA* e *16s rRNA*, pois são os genes mais utilizados como normalizadores em análises de expressão gênica de *C. pseudotuberculosis*.

No estudo de Pinto e colaboradores (2012) foi utilizada a tecnologia SOLiD™ para investigar o perfil transcricional da linhagem 1002 da *C. pseudotuberculosis* sob condições que simulam o ambiente no hospedeiro: estresse osmótico - BHI suplementado com cloreto de sódio (2 M), acidez (pH de 5,0) – BHI suplementado com ácido clorídrico, para simular a acidez dos macrófagos, choque térmico (50°C) e condições de controle. Utilizamos os dados gerados neste estudo para identificar possíveis genes normalizadores.

As análises do transcriptoma foram realizadas por uma abordagem baseada no genoma de referência de *Corynebacterium pseudotuberculosis* 1002. Os dados brutos obtidos a partir do sequenciamento do cDNA na plataforma SOLiD System Versão 3 foram mapeados contra o genoma de referência de *C. pseudotuberculosis* utilizando o TopHat (TRAPNELL et al., 2012), onde se utilizou 18,783,810 , 21,622,844 , 25,235,478 e 17,393,077 de leituras, representando respectivamente as condições 2M, pH, 50°C e condição controle.

O resultado do mapeamento foi armazenado em um arquivo BAM, o qual foi utilizado como arquivo de entrada para o Cufflinks (TRAPNELL et al., 2010), que realizou a análise do perfil de expressão dos genes anotados no genoma de referência. Este gera um arquivo de saída com os valores de expressão de cada gene, em uma unidade que já é normalizada. A normalização é realizada pela medida FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped). O valor de FPKM é a medida de abundância relativa do transcrito e é calculado pela fórmula a baixo:

$$\text{FPKM} = \frac{\text{Total de leituras na região dos exons}}{\text{Leituras mapeadas (milhões) x Tamanho do gene em pares de bases}} \times 10^9$$

Com os valores da expressão de todos os genes anotados, utilizou-se um *in-house script* para extrair as informações dos genes *adk*, *atpA*, *dnaE*, *dnaG*, *dnaK*, *efp*, *fusA*, *glyS*, *gltS*, *gyrA*, *gyrB*, *hsp65*, *infB*, *leuA*, *katG*, *odhA*, *rpoB*, *rpoC*, *secY*, *Cp1002\_0639*, *Cp1002\_1639*, *pncA*, *sodA*, *sigA*, *ychF*. Foi realizada uma busca destes vinte e cinco genes no genoma de *C. pseudotuberculosis* onde só foram encontrados dezenove genes.

Um gene *housekeeping* candidato a gene normalizador da reação de RT-qPCR foi definido como um gene com a expressão mais estável, ou seja, com a mínima variação de expressão gênica quando comparado em condições normais e em condições de estresse, isto é, um gene

com um pequeno coeficiente de variação (CV) e *maximum fold change* < 2 (MFC, a relação entre os valores máximos de FPKM e valores mínimos observados no conjunto de dados). Para cada gene, o MFC e CV foram calculados através dos valores de FPKM transformados em logaritmo na base 2 ( $\log_2$ ). Genes com valores de CV abaixo de 4% e MCF com valores inferiores a 2 foram considerados como genes expressos de forma estável, potenciais genes normalizadores (JONGE et al., 2007).

#### **4.8.5.1 Análises transcricionais**

Oito candidatos a genes referência apresentaram expressão mais estável em condições avaliadas por RNA-seq e foram selecionados para que sua expressão fosse validada em duas condições de cultivo, BHI e SFB através da técnica de RT-qPCR. O gene *16S rDNA* é o gene mais comumente utilizado como controle endógeno em estudos da expressão gênica em bactérias, assim este também foi avaliado. Os passos para extração do RNA, síntese do cDNA, são os mesmos descritos anteriormente (4.8.2 e 4.8.3).

#### **4.8.5.2 Confeção de oligonucleotídeos iniciadores**

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores foi baseado nas sequências únicas de DNA codificante identificadas para os 8 genes selecionados, *dnaG*, *rpoC*, *gyrA*, *gyrB*, *efp*, *rpoB*, *fusA* e *atpA*. A concepção dos iniciadores foi realizada com emprego da ferramenta “PrimerQuest” (IDT SciTools), foram considerados desejáveis a temperatura de anelamento dos pares em torno de 60°C e o tamanho variável entre 80 pb e 120 pb (pares de bases) para as sequências-alvo amplificadas. Os iniciadores selecionados (Tabela 4) foram ainda analisados com auxílio da ferramenta “Oligo Analyzer v3.1” (IDT SciTools) quanto às probabilidades de formação de grampos, homodímeros e heterodímeros, estruturas que podem prejudicar a eficiência de amplificação durante as reações de qPCR.

#### **4.8.5.3 PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)**

Amostras de cDNA obtidas através da técnica de transcrição reversa foram submetidas a amplificação por RT-qPCR com o uso dos pares de iniciadores listados na Tabela 4. O equipamento 17K Flex Real-Time PCR System (QuantStudio™) foi empregado para as

reações de RT-qPCR o qual permite acompanhar em tempo real as ampliações dos fragmentos de DNA, utilizando a fluorescência emitida pelo reagente SYBR® Green.

**Tabela 4** - Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados no ensaio de RT-qPCR

Gene-	Descrição	Iniciador	Sequência	Amplicon
<i>dnaG</i>	DNA primase	RTdnaG_F	5'TCGTAAAGATCCACGGTTATGG 3'	108
		RTdnaG_R	5'CTAAACGCATCGTCTGGTAGAT 3'	
<i>rpoC</i>	Subunidade beta da RNA polimerase	RTrpoC_F	5'GGGTA CTCTCGTTGACCTTTC3'	107
		RTrpoC_R	5'CCTTGGTGATACCCATGATCTC 3'	
<i>gyrA</i>	Subunidade A da DNA girase	RTgyrA_F	5'CCGCTCTATCTTTGTCCTTATC 3'	103
		RTgyrA_R	5'TCGTTGACGTTGTCCCATAC 3'	
<i>gyrB</i>	Subunidade B da DNA girase	RTgyrB_F	5'GACCCTTTCTCTGACGGATAAG 3'	119
		RTgyrB_R	5'CATCGGCATCGGAGTCTATTT 3'	
<i>Efp</i>	Fator de alongamento G	RTefp_F	5'CTCAGGCAAGGTTACGGATAAA 3'	103
		RTefp_R	5'GTTGCTGCCATCGTTGTAAAG 3'	
<i>rpoB</i>	Subunidade beta da RNA polimerase	RTrpoB_F	5'CGTAAGCGATGAGGCACTAATA 3'	100
		RTrpoB_R	5'CGTCGAACTAGCCAGATACATAC3'	
<i>fusA</i>	Fator de alongamento P	RTfusA_F	5'GAGTACATGGGCGACGTTATC 3'	100
		RTfusA_R	5'GAACCTTTGCCTTGACTACCT 3'	
<i>atpA</i>	Cadeia alfa da ATP sintase	RTatpA_F	5'CTACCTCCACTCTCGTCTCTT 3'	103
		RTatpA_R	5'GTCGTTAGCCTTGGTTTCAATG3'	
<i>16s rDNA</i>	RNA ribossômico 16S	RT16S_F	5'- CAGCTCGTGTCTGAGATGT-3'	92
		RT16S_R	5'- CTCTCATGAGTCCCCACCAT-3'	

#### 4.8.5.4 Determinação da eficiência dos iniciadores

A eficiência de amplificação para os 8 iniciadores utilizados foi avaliada a partir de cinco diluições seriadas de cDNA (1:1; 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16), as reações de RT-qPCR foram realizadas como descrito no item 4.8.4. Os ciclos de amplificação (Cq) obtidos para cada gene foram utilizados para gerar a curva padrão de cada par de *primer* testado, sendo calculados os coeficientes de correlação entre os pontos e a reta plotada para validação da regressão, com o emprego do *software* Excel 2013. A partir dos Cqs obtidos também foi possível calcular a eficiência de amplificação para cada par de iniciadores utilizados. O valor

de eficiência (E) foi estimado com o auxílio da “qPCR efficiency calculator” Thermo Scientific (Life Science Research) que utiliza a equação  $E = 10(-1/\text{slope})$  (Rasmussen, 2001), onde o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida da regressão entre os valores de C<sub>q</sub> dos transcritos e os valores do logaritmo das diferentes diluições de cDNA. A faixa de valores de eficiência recomendada para a validação dos ensaios de qPCR e estimação dos níveis transcricionais pelo emprego do método de Ct comparativo é de 0,9 a 1,1, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110%. (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; RASMUSSEN, 2001).

#### 4.8.5.5 Avaliação da estabilidade da expressão de genes normalizadores

Para verificar a estabilidade dos normalizadores foram comparadas as alterações nos níveis de expressão nas amostras do SFB em relação às amostras controle (BHI). Os valores de Ct a partir dos oitos genes normalizadores avaliados neste estudo, foram convertidos em quantidades relativas, corrigidos pelos valores de eficiência de amplificação para cada par de genes, utilizando a fórmula descrita por Galisa e colaboradores (2012),  $Q = E^{\Delta C_t}$ , onde E refere-se ao valor de eficiência de amplificação do gene, e o  $\Delta C_t$  refere-se a diferença entre o menor valor de Ct encontrado entre os dados e o Ct da amostra em questão. Esses valores normalizados são importados para o Software NormFinder (ANDERSEN et al., 2004).

NormFinder utiliza um algoritmo para identificar o gene normalizador otimizado entre um conjunto de genes, através do *ranking* desses genes de acordo com a sua variação de expressão inter e intragrupo (S). O gene referência mais estável é aquele que obter o menor valor S (LIU et al., 2013)

#### 4.8.6 Validação da ausência de DNA genômico

Após as reações de transcrição reversa, é importante que todo o DNA presente nas amostras seja correspondente ao DNA complementar gerado e não ao DNA genômico. Por isso, durante o processo de extração de RNA total de *C. pseudotuberculosis* (item 4.8.2) foi utilizada a coluna “RNeasy Mini spin column” (Qiagen™), dotada de uma membrana com sílica, otimizada para reter o DNA genômico presente na amostra. As amostras ainda foram submetidas ao tratamento com DNase (Qiagen™) antes de serem eluídas, conforme as

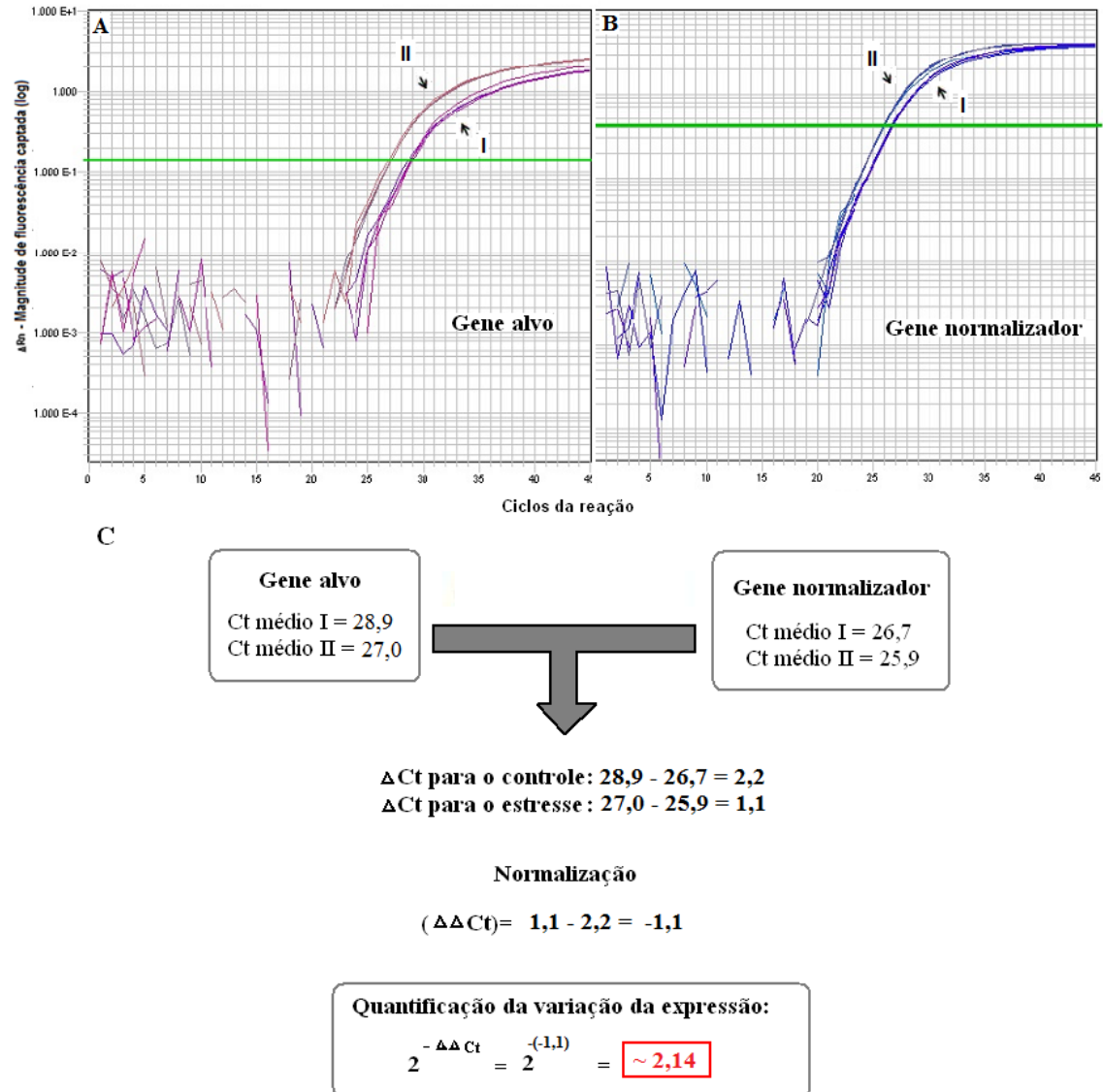
recomendações do fabricante, para eliminação de DNA residual, e permitir a eluição apenas do RNA.

Para validar se a remoção de DNA genômico foi eficiente, as amostras de RNA total foram submetidas à amplificação por RT-qPCR utilizando os mesmos parâmetros utilizados para as amostras de cDNA. Esta etapa foi realizada para todas as amostras e genes analisados neste estudo.

#### **4.8.7 Reações para quantificação relativa e análise de expressão diferencial**

Cada amostra de cDNA foi submetida a 4 réplicas técnicas de reações de RT-qPCR correspondentes a cada par de iniciadores utilizado (Tabela 1 e 4). As curvas de amplificação ( $\Delta Rn$  versus Ciclo), plotadas em tempo real pelo *software* SDS v2.4 (Applied Biosystems™) durante o processamento das reações nos termocicladores “7900 Real-Time PCR System” e do “QuantStudio 17K Flex Real-Time PCR System”, foram utilizadas como parâmetros para a definição do limiar de detecção dos produtos amplificados. Este limiar foi configurado para cruzar a fase exponencial logarítmica das curvas de amplificação, etapa em que a fluorescência detectada é resultado do acúmulo de produtos amplificados, acima dos níveis de fluorescência de fundo. Os resultados brutos obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção. Da média dos Cts obtidos para o gene-alvo, relativa a uma determinada condição de estresse, foi subtraída a média calculada para os Cts do gene *SigA* (Figura 7A e B) e dos outros 8 genes normalizadores. O valor gerado, denominado  $\Delta Ct$ , representa a normalização das amplificações do gene-alvo em relação às amplificações do gene normalizador selecionado. O mesmo procedimento de normalização foi adotado para o gene-alvo na cultura em BHI (cultura controle). A diferença entre o valor de  $\Delta Ct$  para a cultura em SFB e o valor de  $\Delta Ct$  para a cultura controle BHI (chamada  $\Delta \Delta Ct$ ) foi calculada e utilizada para a determinação da potência  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  (Figura 7C). Este valor representa o quanto a transcrição do gene de interesse foi alterada pelo estresse. A significância das alterações detectadas foi avaliada com o emprego do *software* REST 2009 v2.013 (Qiagen).

**Figura 7 - Representação esquemática da normalização do nível de expressão do gene alvo (*SigD*) pela utilização de um gene normalizador (*SigA*) através do método  $\Delta\Delta Ct$ .** A) Amplificações para o gene alvo. B) Amplificações para o gene normalizador. A seta I corresponde a média dos valores de  $Ct$ s para a condição controle, enquanto a seta II indica a média dos valores de  $Ct$ s para a condição de crescimento no SBF. C) Os valores de  $Ct$  são normalizados pelo cálculo da diferença entre os  $Ct$ s do gene alvo e os  $Ct$ s do gene normalizador ( $\Delta Ct$ ). A diferença calculada para cada condição de estresse é então subtraída da diferença calculada para a condição controle ( $\Delta\Delta Ct$ ). A expressão do gene *sigD*, na condição de estresse aumentou cerca de 2 vezes em relação à condição controle, conforme calculado pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



#### 4.8.8 Análise da especificidade das reações de qPCR

Após as etapas de amplificação de cDNA, os termocicladores “7900 Real-Time PCR System” e o “QuantStudio 17K Flex Real-Time PCR System” foram configurados para elevar a temperatura das amostras até 95°C (Tabela 2). Durante este processo, as variações na emissão de fluorescência, em decorrência da liberação de SYBR Green I das cadeias duplas de DNA amplificado, foram detectadas e analisadas pelo *software* SDS v2.4 (Applied Biosystems™).

Os dados gerados permitiram avaliar a temperatura média de hibridização das moléculas de DNA ( $T_m$ ), parâmetro utilizado para a constatação da presença de fragmentos de tamanho específico.

#### **4.9 Predição de genes regulados pelo *sigD***

Raman e colaboradores (2004) descreveram 47 genes regulados pelo fator sigD em *M. tuberculosis*, estes genes foram selecionados e mapeados contra o genoma de *C. pseudotuberculosis* com emprego da ferramenta de bioinformática BLASTp (NCBI), sendo selecionados aqueles que se encontravam dentro do parâmetro de confiabilidade ( $E\text{-value} < 10^{-4}$ ). O  $E\text{-value}$  indica a probabilidade de o alinhamento ocorrer ao acaso e é um cálculo baseado na qualidade do alinhamento e tamanho da base de dados, sendo assim, o mais desejado é que se encontre o  $E\text{-value}$  mais próximo de 0.



**5.1 RESULTADOS PARTE 1**  
**IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES**

### 5.1.1 Identificação de genes normalizadores

Neste estudo avaliou-se 19 genes envolvidos em diferentes funções celulares, como constituinte da RNA polimerase (*rpoB* e *rpoC*), enzimas envolvidas na replicação do DNA (*dnaG*, *gyrA*, *gyrB*), como constituinte da DNA polimerase (*dnaE*), fatores envolvidos na tradução (*efp*, *fusA*, *glyS* e *infB*), envolvido na síntese de ATP (*atpA*), proteínas de ligação a GTP (*ychF*), proteínas de membrana (*secY*), fatores sigma (*sigA*), proteínas que auxiliam no enovelamento das proteínas (*dnaK*), enzimas de vias metabólicas (*odhA* e *leuA*), biossíntese de purinas (*adk*) e defesa antioxidante (*sodA*). Os genes selecionados estão entre os genes descritos anteriormente como genes *housekeeping* em outras espécies, tais como, *Corynebacterium diphtheriae*, *C. glutamicum* e *C. efficiens* e *Mycobacterium tuberculosis*.

Foram realizadas análises do perfil de expressão diferencial dos dados obtidos da RNA-Seq do estudo de Pinto (2012), através do programa Cufflinks, este gera um arquivo de saída com os valores de expressão de cada gene, em uma unidade que já é normalizada. A normalização é realizada pela medida FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped), o objetivo da normalização é remover os efeitos técnicos que ocorrem nos dados, para assegurar que estes tenham o mínimo de impacto nos resultados. No RNAseq, a normalização é padronizada pelo número de leituras no experimento (ROBINSON E OSHLACK, 2010).

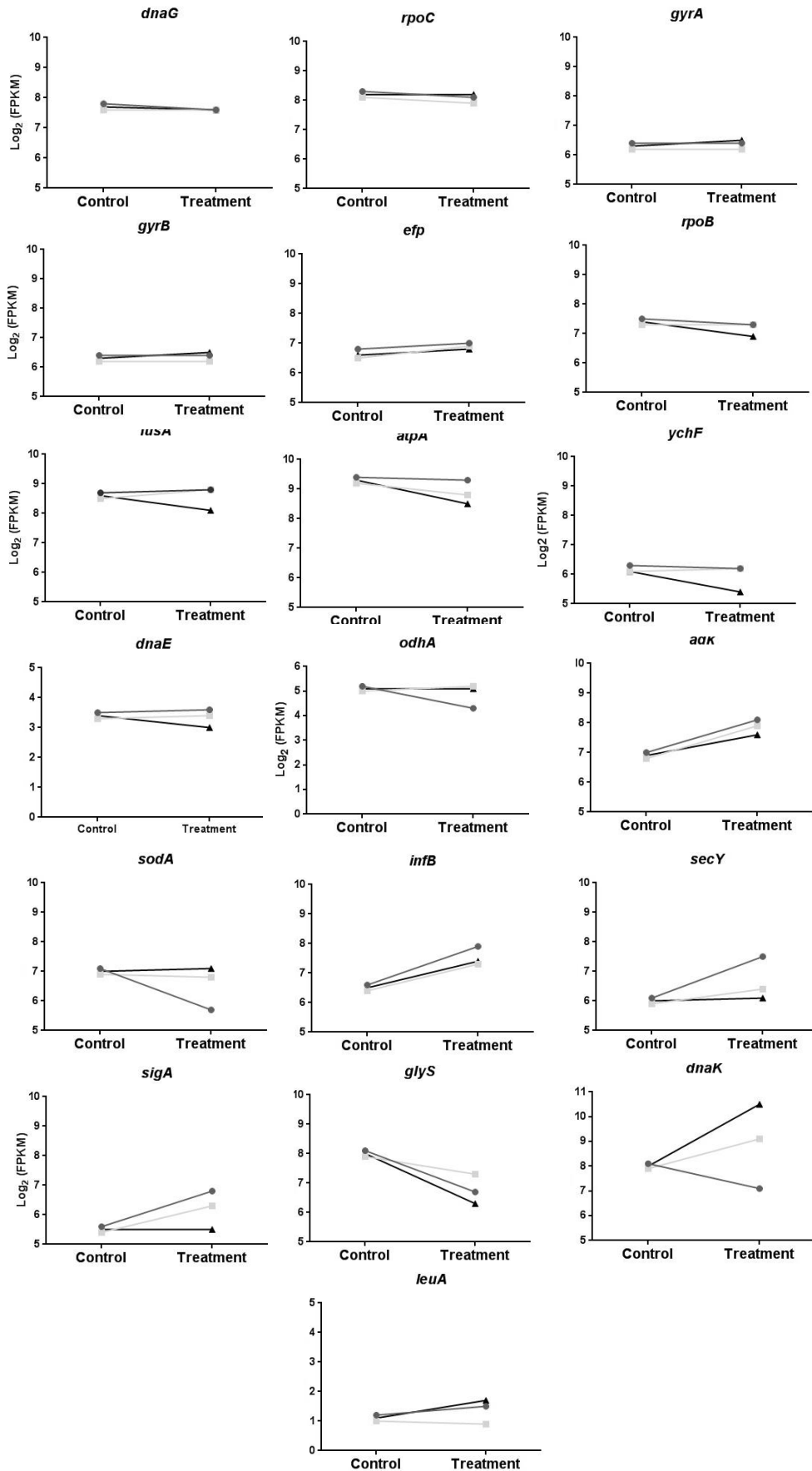
Os valores de FPKM para os 19 genes possíveis candidatos a gene referência são apresentados na Tabela 5. Genes com valores de CV inferior a 4% e MCF inferior a 2 podem ser considerados como expressos de forma estável e assim considerados potenciais genes normalizadores (JONGE et al., 2007), a análise de RNA-Seq mostrou que oito genes cumpriram este critério de expressão estável, os genes *dnaG*, *rpoC*, *gyrA*, *gyrB*, *efp*, *rpoB*, *fusA*, *atpA*. Pode ser observado na Figura 8, que esses genes foram os que apresentaram menores variações do nível de transcrição nas condições de tratamento comparado com a condição de controle.

**Tabela5** - Estabilidade de expressão do RNA de dezenove genes candidatos a genes normalizadores, calculados de acordo com dados de RNA-seq

Número	Gene	Descrição	Média FPKM	FPKM transformado Log <sub>2</sub>	
				CV%	MFC
1	<i>dnaG</i>	DNA primase	20,07	<b>1,09</b>	1,02
2	<i>rpoC</i>	Subunidade beta da RNA polimerase	283,88	<b>1,68</b>	1,05
3	<i>gyrA</i>	Subunidade A da DNA girase	80,99	<b>1,91</b>	1,04
4	<i>gyrB</i>	Subunidade B da DNA girase	150,25	<b>1,91</b>	1,04
5	<i>efp</i>	Fator de alongamento G	110,31	<b>2,75</b>	1,07
6	<i>rpoB</i>	Subunidade beta da RNA polimerase	160,66	<b>2,80</b>	1,08
7	<i>fusA</i>	Fator de alongamento P	391,43	<b>3,07</b>	1,08
8	<i>atpA</i>	Cadeia alfa da ATP sintase	552,18	<b>3,90</b>	1,06
9	<i>ychF</i>	Proteínas de ligação a GTP	67,01	5,40	1,16
10	<i>dnaE</i>	Subunidade alfa da DNA polimerase III	10,47	6,13	1,2
11	<i>odhA</i>	2 - oxoglutarato-desidrogenase (subunidade)	31,85	6,88	1,2
12	<i>adk</i>	Adenosina-quinase	175,82	7,53	1,19
13	<i>sodA</i>	Superóxido dismutase	114,25	7,91	1,24
14	<i>infB</i>	Fator de iniciação IF-2	138,45	8,61	1,2
15	<i>secY</i>	Subunidade da proteína de membrana translocase	86,82	9,40	1,27
16	<i>sigA</i>	Fator Sigma A	61,78	9,71	1,25
17	<i>glyS</i>	Glicina -tRNA sintetase	181,84	10,15	1,28
18	<i>dnaK</i>	Chaperona Hsp 70	482,44	14,07	1,47
19	<i>leuA</i>	2- Isopropilmalato Sintase	2,39	24,94	1,88

CV = Coeficiente de variação; MFC = Maximum Fold Change; FPKM = Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads. Os melhores genes de referência foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: (I) CV < 4%, e (II) MFC < 2. Esses genes estão marcados em negrito.

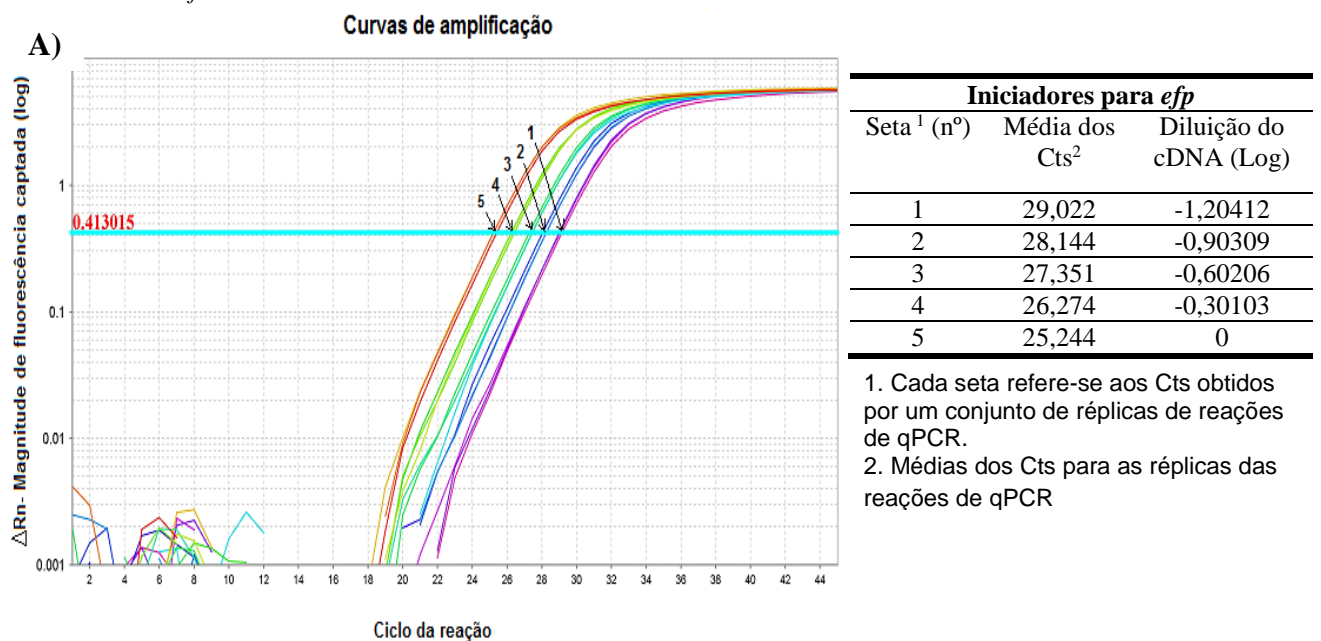
**Figura 8 - Níveis de transcrição de 19 diferentes candidatos a genes de referência de *Corynebacterium pseudotuberculosis* durante o crescimento em diferentes condições ambientais.** Os níveis de transcrição foram determinados como FPKM a partir de experimentos de RNA-seq e apresentados como  $\text{Log}_2$ . Valores de FPKM foram calculados para cada gene candidato durante o crescimento bacteriano em meio de controle, exposto ao calor ( $\square$ ), ácidos ( $\blacktriangle$ ) ou osmótica ( $\bullet$ ), como descrito Pinto et al. *Integr. Biol.* 4:789-794, 2012.

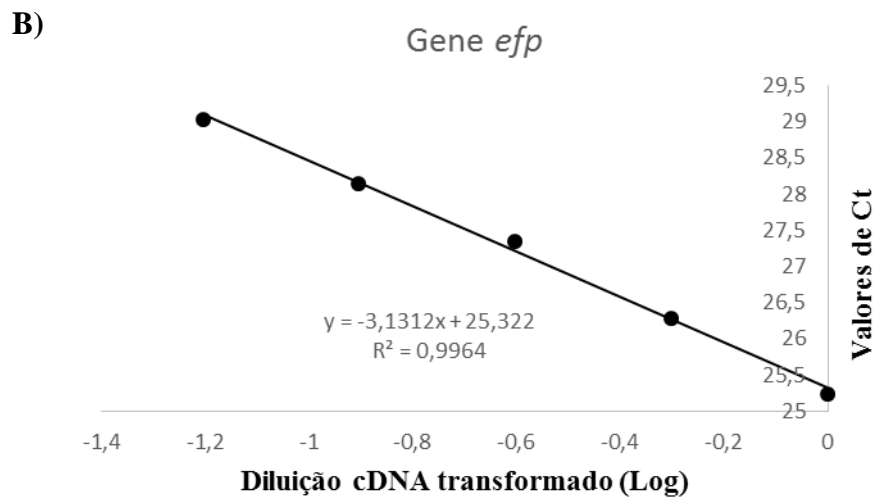


### 5.1.1.1 Determinação da eficiência dos iniciadores

A eficiência de amplificação para cada par de iniciadores utilizado nas reações de qPCR foi determinada conforme descrito no item 4.8.5.1.4 e são mostrados na Figura 9, dados relativos às amplificações por qPCR utilizando os iniciadores do gene *efp*. A determinação da variação entre Cts obtidos para as diferentes diluições de cDNA é essencial à realização dos cálculos de regressão linear e do coeficiente de correlação ( $R^2$ ). De acordo com os ensaios realizados, a eficiência de amplificação obtida para o gene *efp* foi aproximadamente 1,03 ou seja 103% de eficiência. De forma geral, como pode ser observado na Tabela 6 foram alcançadas boas eficiências de amplificação para todos os pares de iniciadores, com exceção do gene *gyrB* que obteve um valor de eficiência muito alto, o que resultou na exclusão deste gene nas análises futuras. Foi considerado valores de eficiência entre 0,9 a 1,1, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90-110% e recomendados para validação dos ensaios de RT-qPCR por (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; RASMUSSEN, 2001).

**Figura 9 - Determinação da eficiência de amplificação para os pares de iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR. Foram realizadas 5 diluições seriadas a partir de amostra de cDNA obtida da cultura de *C. pseudotuberculosis* em BHI. Cada par de iniciadores teve sua eficiência testada para um conjunto de diluições de uma mesma amostra de cDNA. A) Resultado das amplificações dos iniciadores do gene *efp*. É possível observar as curvas de amplificação referentes a cada diluição de cDNA testada (tabela anexa). É notável a relação inversa existente entre a quantidade de cDNA empregada na reação e o valor alcançado de Ct. B) Regressão linear baseada nas médias dos Cts para amplificações relativas ao gene *efp*. No gráfico, são mostrados a equação de 1º grau correspondente à reta e o valor encontrado para o coeficiente de correlação ( $R^2$ ;  $p < 0,05$ ), calculados em *software* Excel.**





**Tabela 6** - Cálculo da eficiência de amplificação dos pares de *primers* utilizados nas reações de qPCR.

<b>Gene-</b>	<b>Slope</b>	<b>R<sup>2</sup><sup>a</sup></b>	<b>Eficiência</b>
<i>atpA</i>	-3,02	0,99	1.10 (110%)
<i>dnaG</i>	- 2,98	0,98	1.13 (113%)
<i>efp</i>	-3,13	0,99	1.03 (103%)
<i>fusA</i>	- 2,27	0,99	1.15 (115%)
<i>gyrA</i>	-2,94	0,99	1.10 (110%)
<i>gyrB</i>	- 0,209	0,09	-
<i>rpB</i>	- 2,98	0,99	1.14 (114%)
<i>rpoC</i>	-3,22	0,99	1.04 (104%)
<i>16S</i>	- 2,86	0,99	1.16 (116%)

<sup>a</sup> R<sub>2</sub>, coeficiente de correlação do *slope* da curva padrão.

## 5.1.2 Análises transcricionais

### 5.1.2.1 RNA total obtido e transcrição reversa

RNA total, extraído como descrito no item 4.7.2, foi obtido para as diferentes amostras em quantidades suficientes para a realização da reação de transcrição reversa. As concentrações observadas para as amostras das culturas no SBF e no BHI e suas respectivas réplicas biológicas estão dispostas na tabela 7, e as quantidades que foram empregadas para a obtenção de cDNA.

**Tabela 7** - Rendimentos das extrações de RNA total das amostras de BHI e SFB e quantidades empregadas nas reações de transcrição reversa. As razões de absorbância estimadas para as amostras indicaram valores entre 1,8 e 2,0 (260 nm / 280 nm).

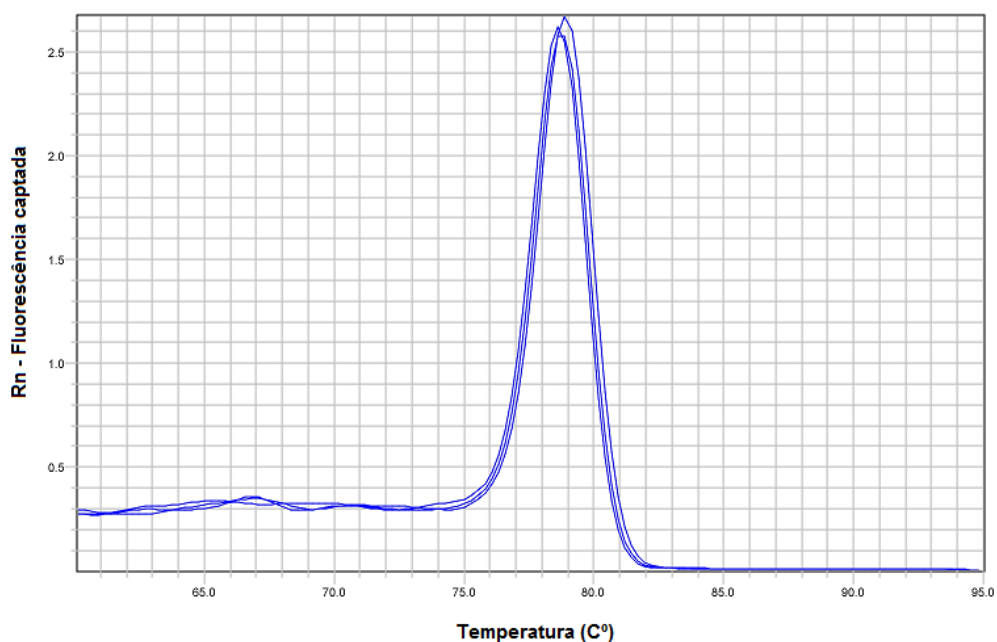
Condição avaliada	Réplica biológica	Concentração de RNA ng/ $\mu$ L	Quantidade de RNA empregado na RT (vf= 20 ng/ $\mu$ L)
BHI	I	53,8	205,5 ng
	II	41,1	205,5 ng
SFB	I	62,3	205,5 ng
	II	56,6	205,5 ng

### 5.1.2.2 Reações de PCR quantitativa

#### 5.1.2.2.1 Especificidade das reações de qPCR através de curvas de dissociação

Foi verificado, através da curva de dissociação, a especificidade de cada conjunto de iniciadores. Todas as curvas geradas para um mesmo par de iniciadores (Tabela 4) apresentaram picos máximos de fluorescência próximos, relativos à temperatura média de hibridização do produto amplificado (Figura 10).

**Figura 10** - Curvas de dissociação contínua obtidas para os produtos amplificados relativos aos transcritos do gene *efp*. É possível observar picos aproximados de fluorescência entre as reações, indicando a presença de um fragmento de DNA amplificado específico, cuja média da temperatura de dissociação é de 78,5°C.



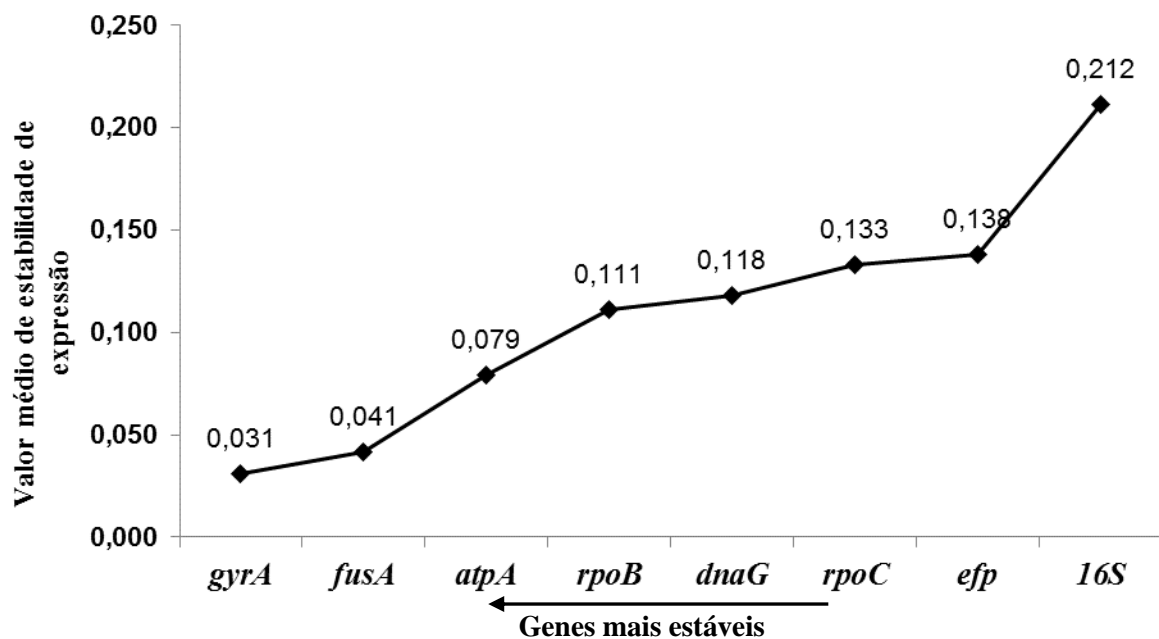
### 5.1.2.2 Validação da ausência de DNA genômico

A confirmação da ausência de DNA genômico nas amostras de RNA foi avaliada conforme a metodologia descrita no item 4.8.6. Não foram detectadas curvas de amplificações nas reações de qPCR utilizando os pares de iniciadores para os genes alvos deste trabalho, validando a ausência de contaminação por DNA genômico.

### 5.1.2.3 Avaliação da estabilidade da expressão de genes normalizadores

Os valores de Ct a partir dos oitos genes normalizadores avaliados neste estudo, foram convertidos em quantidades relativas, corrigidos pelos valores de eficiência de amplificação para cada par de genes, como descrito no item 4.8.5.1.5. Esses valores normalizados foram importados para o *software* NormFinder para determinar a estabilidade de expressão dos genes candidatos a genes normalizadores. Quanto menor o valor mais estável é a expressão do gene, sendo assim o NormFinder sugeriu *gyrA* o melhor gene, com expressão mais estável, com valores quase próximos a zero (0,031), e a melhor combinação de normalizadores, *gyrA* e *fusA*, estabilidade de 0,034, porém todos os genes apresentaram valores médios de estabilidade de expressão baixo, podendo ser considerados todos estáveis (Figura 11).

**Figura 11** - Estabilidade de expressão para os genes candidatos a gene normalizador utilizando o *software* NormFinder.





**5.2 RESULTADOS PARTE 2**  
**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS FATORES SIGMA**

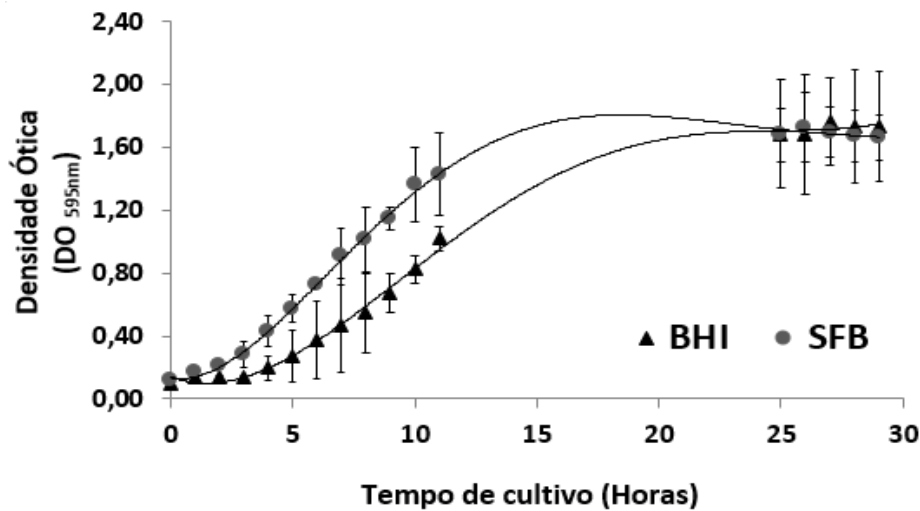
### 5.2.1 Curvas de crescimento da *C. pseudotuberculosis* em caldo infusão cérebro coração (BHI) e soro bovino fetal (SFB)

Na figura 12 são apresentadas as curvas de crescimento de *C. pseudotuberculosis* nos dois meios de cultivo diferentes, no BHI e SFB, construídas através de leituras de densidade ótica ( $DO_{595nm}$ ) das culturas em triplicata, a cada hora, durante 30 horas.

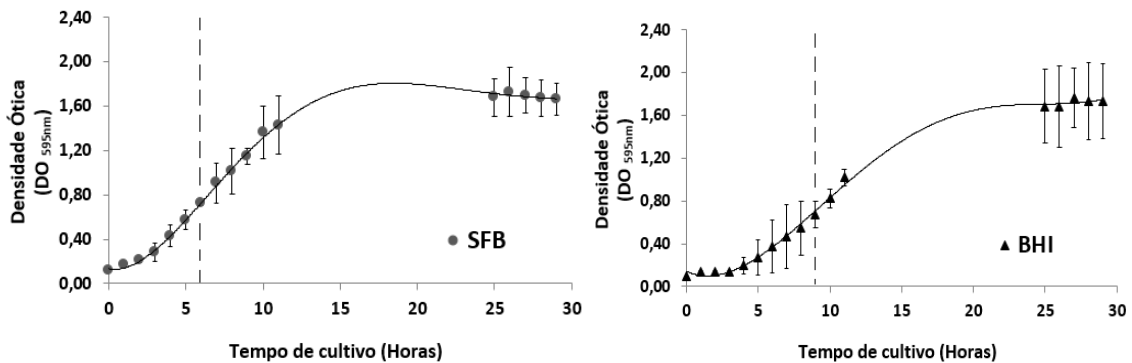
As culturas foram constantemente monitoradas até atingirem a  $DO_{595nm}$  de 0,7, onde neste ponto foram retiradas alíquotas de 2 ml das culturas, em duplicatas, destinadas a extração de RNA total (Figura 12B)

**Figura 12 - Crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caldo infusão cérebro coração (BHI) e soro bovino fetal (SFB).** Os cultivos, mantidos a 37°C e sob agitação a 140 rpm, foram monitorados por meio de leituras de Densidade ótica ( $DO_{595nm}$ ) e citometria de fluxo (dados não mostrados). **B)** As linhas serrilhadas paralelas ao eixo Y indicam os momentos em que foram isoladas alíquotas das culturas destinadas à extração de RNA total.

A)



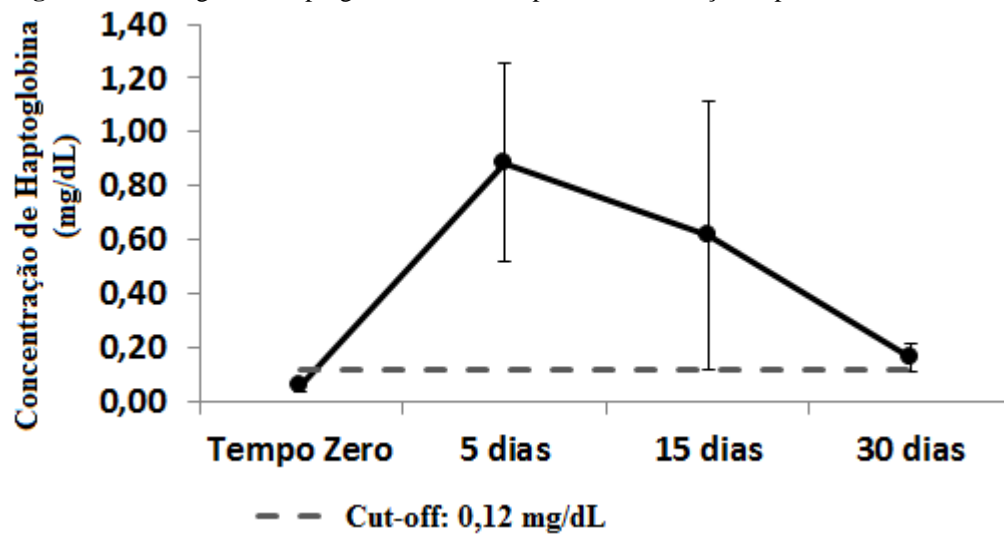
B)



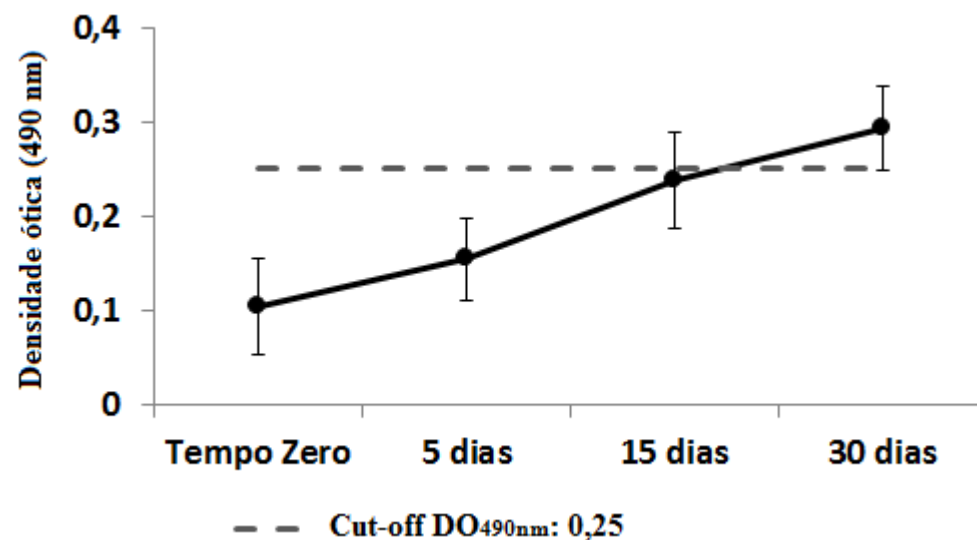
### 5.2.2 Acompanhamento da infecção experimental

Grupo de três ovinos foram acompanhados ao longo da infecção experimental, em paralelo as punções aspirativas, foram realizadas coletas de sangue dos animais na veia jugular, para acompanhar a evolução clínica da doença por meio da dosagem das proteínas de fase aguda, a haptoglobina e através da dosagem de imunoglobulinas IgG, durante 30 dias da infecção (Figuras 13 e 14).

**Figura 13** - Dosagem de haptoglobina durante o período de infecção experimental dos ovinos.



**Figura 14** - Dosagem da imunoglobulina IgG no acompanhamento da infecção experimental dos ovinos.



### 5.2.3 Análises transcricionais

#### 5.2.3.1 RNA total obtido e transcrição reversa

RNA total, extraído como descrito no item 4.8.2, foi obtido para as diferentes amostras em quantidades suficientes para a realização da reação de transcrição reversa. As concentrações observadas para as amostras da punção aspirativa e das amostras das culturas no SFB e no BHI e suas respectivas réplicas biológicas estão dispostas na tabela 8 e 9, respectivamente, assim como as quantidades que foram empregadas para a obtenção de cDNA.

**Tabela 8** - Rendimentos das extrações de RNA total das amostras da punção aspirativa e quantidades empregadas nas reações de transcrição reversa. As razões de absorvância estimadas para as amostras indicaram valores entre 1,8 e 2,0 (260 nm / 280 nm).

Condição avaliada	Réplica biológica	Concentração de RNA ng/ $\mu$ L	Quantidade de RNA empregado na RT (vf= 20 ng/ $\mu$ L)
5 dias após a infecção	I	2,0	16,9 ng
	II	6,9	16,9 ng
	III	11,7	16,9 ng
30 dias após a infecção	I	35,7	67,8 ng
	II	20,3	67,8 ng
	III	5,2	67,8 ng

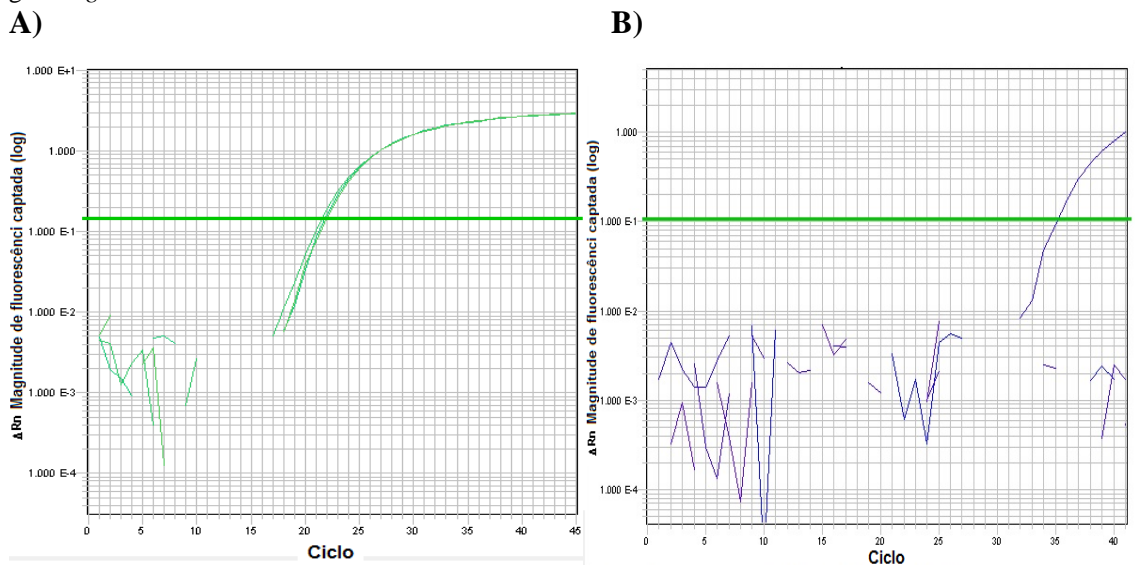
**Tabela 9** - Rendimentos das extrações de RNA total das amostras da cultura do SFB e BHI e quantidades empregadas nas reações de transcrição reversa. As razões de absorvância estimadas para as amostras indicaram valores entre 1,8 e 2,0 (260 nm / 280 nm).

Condição avaliada	Réplica biológica	Concentração de RNA ng/ $\mu$ L	Quantidade de RNA empregado na RT (vf= 20 ng/ $\mu$ L)
Soro Fetal Bovino (SFB)	I	10,6	15,6 ng
	II	15,7	15,6 ng
	III	9,0	15,6 ng
Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)	I	4,6	15,6 ng
	II	13,0	15,6 ng
	III	9,2	15,6 ng

### 5.2.3.2 Reações de PCR quantitativa

O RNA total extraído das amostras de punção aspirativa foi obtido em quantidades suficientes para a realização da reação de transcrição reversa (Tabela 8), porém nas reações de PCR quantitativa não houve expressão dos genes codificadores de fatores sigma dessas amostras, podendo indicar que a maior parte do RNA presente na extração advém das células dos ovinos e em menor concentração do RNA da *C. pseudotuberculosis*. Devido à baixa concentração de RNA bacteriano os genes codificadores de fatores sigma não foram expressos nas amostras de punção aspirativa dos animais infectados, apenas o gene *16S* foi expresso, indicando que naquelas amostras o RNA bacteriano estava presente, mas em concentrações insuficientes para que a expressão dos genes dos fatores sigma fossem detectados (Figura 15).

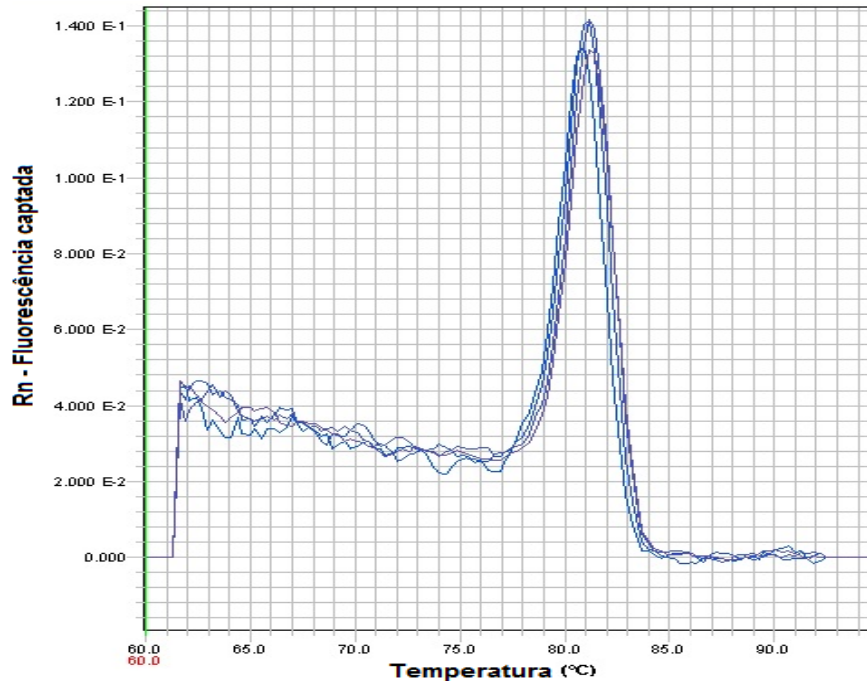
**Figura 15 - Resultado do RT-qPCR de amostra de punção aspirativa de um ovino após 30 dias de infecção experimental.** A) Expressão gênica do 16S da *C. pseudotuberculosis*. B) Ausência de curvas de amplificação do gene *SigA*.



#### 5.2.3.2.1 Especificidade das reações de qPCR através de curvas de dissociação

Curvas de dissociação contínua foram plotadas para todas as reações de qPCR, como descrito no item 4.8.8. Todas as curvas geradas para um mesmo par de iniciadores (Tabela 1) apresentaram picos máximos de fluorescência próximos, relativos à temperatura média de hibridização do produto amplificado (Figura 16).

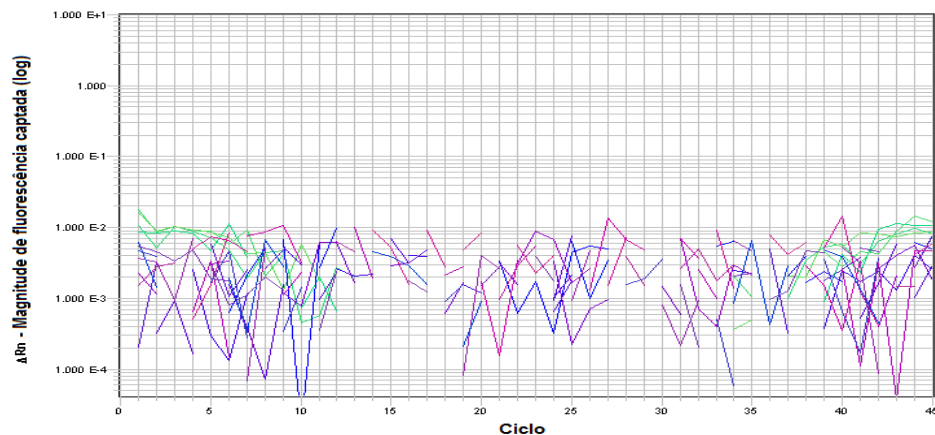
**Figura 16 - Curvas de dissociação contínua obtidas para os produtos amplificados relativos aos transcritos do gene *sigA*.** É possível observar picos aproximados de fluorescência entre as reações, indicando a presença de um fragmento de DNA amplificado específico, cuja média da temperatura de dissociação é de 81,3°C.



#### 5.2.3.2.2 Validação da ausência de DNA genômico

A confirmação da ausência de DNA genômico nas amostras de RNA foi avaliada conforme a metodologia descrita no item 4.8.6. Não foram detectadas curvas de amplificações nas reações de qPCR utilizando os pares de iniciadores para os genes alvos deste trabalho, validando a ausência de contaminação por DNA genômico (Figura 17).

**Figura 17 - Ausência de amplificação por RT-qPCR dos produtos de RNA extraídos de *C. Pseudotuberculosis*.** É possível observar a ausência de curvas de amplificação e de Cts. Apenas a fluorescência de fundo pode ser observada.



### 5.2.3.2.3 Avaliação da expressão gênica diferencial utilizando o *sigA* como normalizador

Reações de qPCR foram realizadas para as amostras relativas a todas as condições utilizando iniciadores citados na Tabela 1. A avaliação da expressão diferencial dos genes codificadores de fatores sigma foi realizada pela quantificação relativa (Ct comparativo). Os valores de Ct são normalizados pelo cálculo da diferença entre os Cts do gene de interesse e os Cts do gene normalizador em cada condição estudada ( $\Delta Ct$ ). Sendo então estimada a diferença entre a média de Cts para a condição de estresse e a média para a respectiva condição controle ( $\Delta \Delta Ct$ ). Os valores de  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  calculados para cada gene, são correspondentes ao número de vezes em que a transcrição gênica aumentou ou diminuiu na condição de estresse (crescimento no SFB) em relação à condição controle, crescimento no BHI.

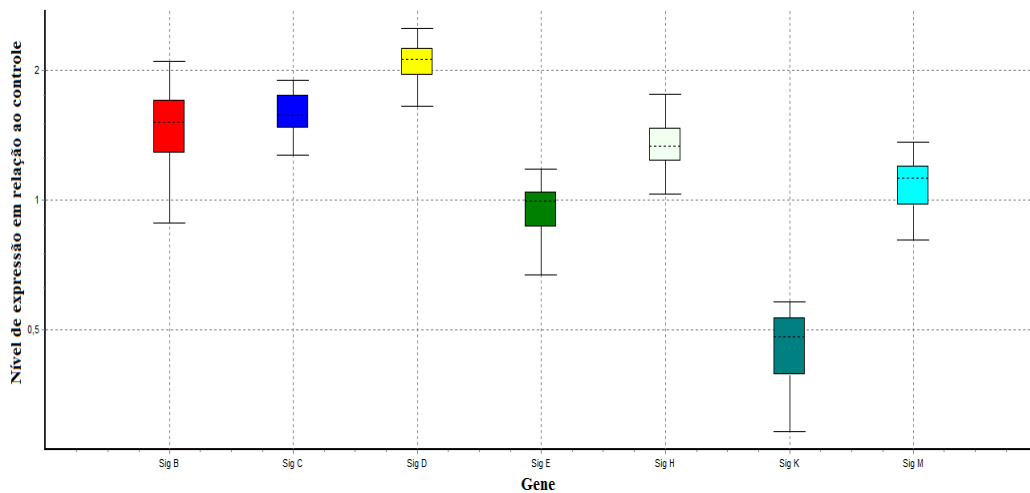
Foi possível detectar alterações nas expressões de vários destes genes durante o crescimento bacteriano em SFB (Tabela 10). A expressão dos genes *sigE* e *sigK* foi reduzida, ao passo que na expressão dos genes *sigB*, *sigC*, *sigH*, e *sigM* não houve alteração significativa, e apenas o gene *sigD*, apresentou níveis transcricionais mais elevados nessa condição estudada (Figura 18).

**Tabela 10** - Expressão diferencial de fatores sigma alternativos de *C. pseudotuberculosis* após crescimento em SFB. O valor da expressão diferencial refere-se à média dos valores de quatro réplicas técnicas. Os valores de Cts do gene de interesse foram normalizados pelos Cts do gene normalizador SigA.

Gene	Expressão diferencial (SFB:BHI)
<i>sigB</i>	1,449
<i>sigC</i>	1,582
<i>sigD</i>	<b>2,050*</b>
<i>sigE</i>	0,939
<i>sigH</i>	1,339
<i>sigK</i>	0,454
<i>sigM</i>	1,075

\*Genes regulados positivamente (*up-regulation*) com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (método Bootstrap  $p < 0,05$ ).

**Figura 18** - Representação gráfica do nível de expressão dos genes **sigB**, **sigC**, **sigD**, **sigE**, **sigH**, **sigK**, **sigM** da *C. pseudotuberculosis* crescida no SFB em relação ao crescimento controle no meio BHI, utilizando o normalizador *sigA*. Representativo de 3 réplicas biológicas e 4 réplicas técnicas.



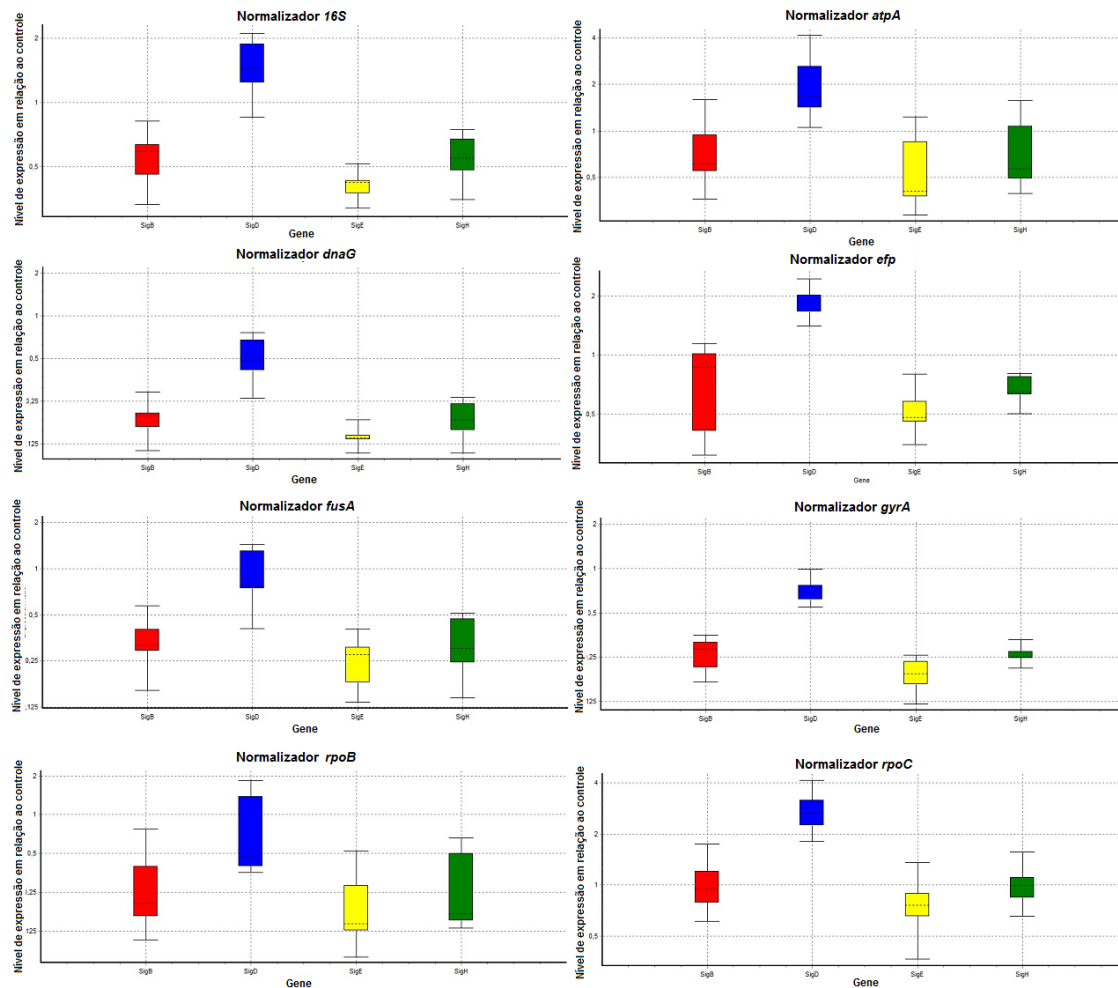
#### 5.2.3.2.4 Avaliação da expressão gênica diferencial utilizando outros normalizadores

Da mesma forma a avaliação da expressão diferencial dos genes codificadores de fatores sigma foi realizada pela quantificação relativa (Ct comparativo). Os valores de Ct foram normalizados pelo cálculo da diferença entre os Cts do gene de interesse e os Cts dos oito genes normalizadores em cada condição estudada.

Assim como os resultados com a normalização com o gene *sigA*, a normalização com diferentes normalizadores demonstrou que apenas o gene *sigD*, apresentou níveis transcricionais mais elevados nessa condição estudada (Figura 19). Corroborando o resultado que o *sigD* é um importante fator de virulência, o qual na condição estudada que simula uma condição de infecção no hospedeiro, este fator sigma foi o único que mostrou alteração transcricional. Mas na normalização com um dos genes que foi indicado como melhor gene normalizador pelo NormFinder, o *gyrA*, não foi observado alterações significativas na expressão do *sigD*. Porém quando este associado a outro normalizador, gene *fusA*, como sugerido pelo NormFinder (*gyrA* + *fusA*), foi observado aumento de 1,6 vezes na expressão gênica do fator SigD (Tabela 11).



**Figura 19 -** Representação gráfica do nível de expressão dos genes **sigB**, **sigD**, **sigE**, **sigH** da *C. pseudotuberculosis* crescida no SFB em relação ao crescimento controle no meio BHI, utilizando 8 diferentes genes normalizadores. Representativo de 2 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas.



**Tabela 11.** Expressão diferencial do fator sigma alternativo SigD de *C. pseudotuberculosis* após crescimento em SFB. O valor da expressão diferencial refere-se à média dos valores de três réplicas técnicas. Os valores de Cts do gene *sigD* foram normalizados pelos Cts dos oito genes normalizadores.

Gene Normalizador	Expressão diferencial do <i>sigD</i> (SFB:BHI)
<i>16s rDNA</i>	2,074*
<i>atpA</i>	2,321*
<i>dnaG</i>	0,789
<i>efp</i>	2,132*
<i>fusA<sup>a</sup></i>	2,458*
<i>gyrA<sup>a</sup></i>	1,036
<i>rpoB</i>	0,900
<i>rpoC</i>	2,865*
<i>fusA e gyrA<sup>b</sup></i>	1,600*

\*Genes regulados positivamente (*up-regulation*) com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (método Bootstrap  $p < 0,05$ ).

<sup>a</sup> Normalizadores considerados mais adequados pelo NormFinder

<sup>b</sup> Melhor combinação de normalizadores sugeridas pelo NormFinder

#### 5.4 Predição de genes regulados por sigD

Das 47 proteínas codificadas pelos genes regulados por sigD em *Mycobacterium tuberculosis* descritas por Raman et al. (2004), 18 proteínas foram encontradas em *C. pseudotuberculosis* com uso da ferramenta BLASTp (NCBI), e se encontravam dentro do parâmetro de confiabilidade ( $E\ value < 10^{-4}$ ), como descrito no item 4.9. O  $E\ value$  encontrado foi satisfatório para as proteínas codificadas pelos genes *sigD*, *rpfA*, *dnaK*, *grpE*, *groEL2*, *groEL1*, *groES*, *fadD15*, *trxA1*, *sodA*, *cpfr\_01097*, *cpfr\_01207*, *Cp3995\_0581*, *cmtB*, *fadD32*, *Cp316\_0721*, *lipY*, que também apresentaram cobertura de sequência e similaridade satisfatórias (Tabela 12).

**Tabela 12 - Genes regulados pelo sigD em *M. tuberculosis* e seus correspondentes em *C. pseudotuberculosis*.**

<i>M. tuberculosis</i> <sup>a</sup>		<i>C. pseudotuberculosis</i>		
Gene ID	Descrição	Gene ID	Gene	Descrição
887594	Provável Fator sigma alternativo SigD	12450957	<i>sigD</i>	Fator sigma alternativo SigD
923644	Proteína hipotética	9448529	<i>rpfA</i>	Fator Promotor de ressuscitação
885946	Provável proteína chaperona DnaK	13126713	<i>dnaK</i>	Proteína chaperona DnaK
923540	Proteína chaperona GrpE	12452534	<i>grpE</i>	Proteína chaperona GrpE
886354	Proteína chaperona GroEL2	9449776	<i>groEL2</i>	Proteína chaperona
887877	Proteína chaperona GroEL1	9448350	<i>groEL1</i>	Proteína chaperona
887583	Proteína chaperona GroES	9448349	<i>groES</i>	Proteína chaperona
887456	Ligase de ácidos graxos de cadeia longa- CoA	12300610	<i>fadD15</i>	Ligase de ácidos graxos de cadeia longa- CoA
886241	Tiorredoxina	11893577	<i>trxA1</i>	Tiorredoxina
886174	Superóxido Dismutase	11966601	<i>sodA</i>	Superóxido Dismutase
885678	Provável transportador de carboidratos do tipo ABC	9449044	<i>cpfr_01097</i>	Transportador de carboidratos do tipo ABC
887218	Proteína hipotética	9449159	<i>cpfr_01207</i>	Proteína hipotética

885430	Proteína hipotética	11675652	<i>Cp3995_0581</i>	Proteína hipotética
923001	Esterase, antígeno 85-C	9449932	<i>cmtB</i>	Provável esterase
925159	Ácido graxo de cadeia longa - CoA ligase	11674887	<i>fadD32</i>	Ácido graxo de cadeia longa - AMP ligase
923780	Desidrogenase de cadeia curta	11892085	<i>Cp316_0721</i>	Desidrogenase de cadeia curta
924299	Proteína hipotética	13126614	<i>lipY</i>	Lipase secretora

<sup>a</sup> Referência: Raman et al. (2004)

## 6 DISCUSSÃO

No âmbito da análise da expressão gênica diferencial, a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) tem se tornado um dos principais métodos para análise do perfil de expressão gênica (GACHON et al., 2004). No entanto, para uma correta interpretação dos dados analisados, uma normalização eficiente torna-se necessária para uma confiabilidade dos resultados, especialmente na verificação da relevância biológica de pequenas diferenças ou no estudo de amostras de diferentes tecidos ou órgãos (EXPÓSITO-RODRIGUEZ et al., 2008; GUÉNIN et al., 2009).

Muitos genes são conhecidos como constitutivos e conseqüentemente muito utilizados como normalizadores em análises de RT-qPCR. Porém, mesmo genes envolvidos em processos básicos do metabolismo celular podem apresentar variações significativas de expressão, não sendo assim adequados para a utilização como controle interno de determinadas situações (CZECHOWSKI et al., 2005; BASTOLA *et al.*, 2007; GUÉNIN et al., 2008). O gene normalizador ideal não deve alterar a sua expressão, independentemente das condições experimentais, incluindo diferentes tipos de tecidos, estádios de desenvolvimento, e/ou tratamentos experimentais.

Na literatura disponível sobre análise da expressão diferencial em *C. pseudotuberculosis* o gene *16s rDNA* é o gene mais utilizado para normalizar as reações de RT-qPCR (TAYLOR E MRKUSICH, 2014). Inicialmente neste estudo, o gene *16S rDNA* seria utilizado como gene normalizador, mas após experimentação foi observado que o gene *sigA* se apresentou melhor como candidato a normalizador, onde seus níveis transcricionais não alteraram muito nas duas situações analisadas. Diante da falta de padronização quanto à escolha de genes normalizadores estáveis para análise da expressão gênica da *C. pseudotuberculosis*, este trabalho analisou o padrão de expressão de oitos genes *housekeeping* candidatos a normalizadores, previamente selecionados através de análises de bioinformática, em dois meio de cultivo da *C. pseudotuberculosis*, um meio padrão de cultivo (BHI) e um meio que mimetiza o crescimento no hospedeiro (SFB).

Neste estudo avaliou-se 19 genes envolvidos em diferentes funções celulares. Pinto e colaboradores (2012) investigou o perfil transcricional da linhagem 1002 da *C. pseudotuberculosis* através do RNAseq, sob condições que simulam o ambiente no

hospedeiro: estresse osmótico (2 M), acidez (pH) e choque térmico (50°C), através dos dados gerado por esse estudo pode-se analisar a expressão diferencial desses genes *housekeeping*. Os genes selecionados estão entre os genes descritos anteriormente como genes de *housekeeping* em outras espécies, tais como, *C. diphtheriae*, *C. glutamicum* e *C. efficiens* e *M. tuberculosis*. Outros dois genes foram adicionados a análise, o *sigA* e *16s rRNA*, pois são os genes mais utilizados como normalizadores em análises de expressão gênica de *C. pseudotuberculosis*, porém não foi possível analisar o gene *16s rRNA* pois esse não foi encontrado nos dados gerados pelo estudo da RNA-Seq.

Os valores da medida de abundância relativa de cada transcrito, valor de FPKM para os 19 genes possíveis candidatos a gene referência são apresentados na Tabela 5. Genes com valores de CV inferior a 4% e MCF inferior a 2 foram considerados como expressos de forma estável e assim considerados potenciais genes normalizadores (JONGE et al., 2007), a análise de RNA-Seq mostrou que oito genes cumpriram este critério de expressão estável, os genes *dnaG*, *rpoC*, *gyrA*, *gyrB*, *efp*, *rpoB*, *fusA*, *atpA*. Como pode ser observado na Figura 7, esses genes foram os que apresentaram menores variações de expressão nas condições de tratamento comparado com a condição de controle.

Neste estudo do RNA-seq o gene codificador do *sigA*, não se apresentou como um bom candidato a gene normalizador da *C. pseudotuberculosis*, pois apresentou o CV= 9,71%. Evidências provenientes de estudos anteriores com fatores sigma em outras bactérias sugerem que este fator sigma seja um bom gene normalizador. Como no estudo de Manganeli e colaboradores (1999) que realizaram uma avaliação da transcrição diferencial de 10 genes de fatores sigma da bactéria *M. tuberculosis* durante a exposição a uma série de condições ambientais. Observaram que os níveis de correspondentes ao *sigA* estavam presente em níveis iguais em algumas condições testadas, utilizando deste transcrito como um gene de referência, para calcular os níveis de transcrição de outros genes de fatores sigma.

Neste sentido, os 8 genes identificados no estudo de bioinformática, como bons genes normalizadores, e do gene *16s rDNA* que foi incluído, foram avaliados sua estabilidade de expressão, através da técnica de RT-qPCR. Primeiramente a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi avaliada a partir de diluições seriadas do cDNA e construção de curva padrão, sendo calculados os coeficientes de correlação entre os pontos e a reta plotada para validação da regressão, onde todos os genes analisados encontravam-se dentro da faixa

de valores de eficiência recomendado, 0,9 a 1,1 (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001; RASMUSSEN, 2001), com exceção do gene *gyrB*, resultando na exclusão deste das análises, pois não apresentou boa eficiência de amplificação para seu par de iniciador. Os dados gerados da análise de expressão pela RT-qPCR foram importados para o *software* NormFinder para determinar a estabilidade de expressão dos genes candidatos a genes normalizadores.

Com o intuito de avaliar a estabilidade de expressão de genes normalizadores, vários algoritmos foram desenvolvidos nos últimos anos, dentre eles o utilizado no programa NormFinder. O algoritmo do programa NormFinder identifica o melhor gene normalizador entre um grupo de genes candidatos com base em sua estabilidade de expressão. Este algoritmo avalia a variação total de expressão dos genes candidatos através da soma da variância (ANDERSEN et al., 2004). De acordo com a análise no programa NormFinder, os melhores genes são caracterizados por apresentar baixos valores de diferença de expressão entre e dentro dos grupos. Na figura 10 foi possível observar maior estabilidade para *gyrA* e *fusA* os quais apresentaram valores médio de estabilidade de expressão 0,031, 0,041 respectivamente. Neste mesmo sentido, Liu e colaboradores (2013), em estudo com *Clostridium ljungdahlii*, mostraram que o gene *gyrA* apresentou a expressão mais estável, sendo sugerido como um bom gene normalizador na condição estudada.

Embora o NormFinder sugira *gyrA* o melhor gene, com expressão mais estável, com valores quase próximo a zero (0,031), e a melhor combinação de normalizadores, *gyrA* e *fusA*, estabilidade de 0,034, todos os genes apresentaram valores médio de estabilidade de expressão baixo, *atpA* (0,079), *rpoB* (0,111), *dnaG* (0,118), *rpoC* (0,133), *efp* (0,138), *16S rDNA* (0,212) podendo ser considerados todos estáveis, como previsto nos dados anteriores de RNA-seq.

O gene *16s rDNA*, o mais utilizado como normalizador em estudos de *C. pseudotuberculosis* (CASTRO, 2009; CARVALHO, 2013), neste estudo se mostrou como um bom gene normalizador onde apresentou uma taxa de estabilidade de expressão de 0,212. No estudo de Castro (2009) o gene *16s rDNA* se apresentou como excelente candidato a normalizador, com expressão estável nas condições estudadas. Por outro lado Liu e colaboradores (2013), em estudo com *Clostridium ljungdahlii*, mostraram que o gene *16s rDNA* foi o gene menos estável. Estas variações na expressão de genes normalmente utilizados como controle

endógeno confirmam a importância de uma escolha correta do gene normalizador para análises de expressão de transcritos por RT-qPCR. Interpretações errôneas podem ser levadas adiante se uma validação prévia de genes de referência não for realizada para as condições de interesse.

Apesar do processo patogênico desencadeado pela *Corynebacterium pseudotuberculosis* estar relativamente bem entendido, ainda há pouco reconhecimento sobre os determinantes moleculares de virulência e controle da expressão gênica desta bactéria (DORELLA et al., 2006a). Em diversos patógenos, os determinantes de virulência estão sob o controle das proteínas reguladoras transcricionais que respondem às modificações do ambiente. Em procariontes, a indução da transcrição de genes que respondem a diferentes estímulos é alcançada pela ativação de fatores sigma alternativos, os quais interagem com a RNA polimerase para ativar a expressão de um conjunto específico de genes envolvidos na resposta adaptativa necessária (HELMANN, 2002; KAZMIERCZAK et al., 2005, STARÓN et al., 2009). Neste contexto, o estudo dos fatores sigma de *C. pseudotuberculosis* é necessário para compreender a regulação da expressão gênica envolvida na resposta adaptativa desta bactéria durante o progresso da infecção. O presente trabalho se propôs a avaliar a expressão dos genes codificadores dos fatores sigma em resposta ao contato com fatores do hospedeiro *in vitro* e *in vivo* na tentativa de confirmar seu envolvimento na resposta adaptativa aos estresses encontrados durante o progresso da infecção.

Primeiramente, foram realizadas curvas de crescimento de *C. pseudotuberculosis* nos dois meios de cultivo utilizados no estudo, o BHI e SFB. Foram escolhidas para os experimentos de análise da expressão diferencial amostras obtidas das culturas quando estas estavam na fase exponencial, mais ou menos 6 horas para a cultura de SFB e de 9 horas para a cultura de BHI. As curvas de crescimento realizadas para a extração de RNA apresentaram perfis semelhantes às réplicas biológicas, evidenciando a reprodutibilidade dos ensaios. Através da curva de crescimento pode-se analisar o perfil de crescimento da bactéria nos dois meios de cultivo, onde é possível observar uma diferença na taxa de crescimento da bactéria nas fases iniciais do crescimento bacteriano e na fase exponencial, indicando que a bactéria tem maior taxa de crescimento no SFB em relação ao BHI.

Os processos infecciosos modificam o equilíbrio das proteínas séricas nos animais, algumas referidas como de fase aguda, sendo estas consideradas indicadoras de resposta sistêmica

frente aos processos inflamatórios e infecciosos (DINARELLO, 1984). Os animais infectados foram acompanhados ao longo da infecção experimental, através da dosagem da proteína haptoglobina, uma proteína marcadora de fase aguda indicadora de resposta sistêmica frente aos processos inflamatórios e infecciosos. A haptoglobina é um dos marcadores mais sensíveis de fase aguda, de processo inflamatório e doenças infecciosas em ruminantes. A existência de uma relação entre níveis de Hp e LC em ovinos tem sido relatado ocorrendo cerca de sete dias (ECKERSALL, 2007). No entanto, dados do estudo de Bastos e colaboradores (2013) mostraram que esta resposta de fase aguda pode ser detectada a partir do primeiro dia de infecção. Com os resultados obtidos neste estudo pode-se inferir que os ovinos encontravam-se na fase aguda da doença após 5 dias da infecção experimental, onde a haptoglobina tinha concentrações significativamente mais elevadas (Figura 13). Outros trabalhos envolvendo a haptoglobina como marcador inflamatório em ovinos foram publicados como o de Bastos e colaboradores (2011) apesar de não estabelecer valores de referência para as raças utilizadas. Estudos indicaram que animais sádios teriam concentrações de haptoglobina próximos ou iguais à zero, as concentrações se elevariam de acordo com o processo inflamatório, porém retornariam aos níveis basais após descanso. (KOSTRO et al. 2009).

A dosagem de IgG anti-*C. pseudotuberculosis* permitiu afirmar que os três ovinos se tornaram soropositivos durante o estudo (IgG +). De acordo com a metodologia utilizada e resultados obtidos, conclui-se que a proteína de fase aguda e a imunoglobulina IgG, permitiram estabelecer os tempos experimentais que correlacionam com as fases aguda de infecção por *C. pseudotuberculosis*. Apesar dos resultados demonstrarem que os ovinos tornaram-se soropositivos durante o estudo, não foi possível analisar a expressão dos genes codificadores de fatores sigma dessas amostras, devido à baixa concentração de RNA bacteriano, apenas o gene *16S* foi expresso, indicando que naquelas amostras o RNA bacteriano estava presente, mas em concentrações insuficientes para que a expressão dos genes dos fatores sigma fossem detectados (Figura 14).

As bactérias possuem uma classe de proteínas que constituem subunidades dissociáveis do cerne da RNA polimerase que são essenciais para o reconhecimento de promotores gênicos para a polimerase, redirecionando o início da transcrição de forma específica (STARÓN et al., 2009). A exposição da bactéria a estímulos ambientais particulares pode alterar a transcrição gênica através de um mecanismo no qual a subunidade sigma primária ligada ao cerne da



RNA polimerase é substituída por um fator sigma alternativo, de modo a ativar a expressão de um conjunto específico de genes envolvidos na resposta adaptativa necessária (HELMANN, 2002; KAZMIERCZAK et al., 2005).

O genoma de *C. pseudotuberculosis* 1002 possui oito genes codificadores de fatores sigmas, os sigmas incluem fator sigma primário *sigA*, o fator *sigB* de resposta geral, e seis fatores alternativos, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigK*, *sigM*, estes últimos foram identificados após a finalização do Projeto Genoma de *C. pseudotuberculosis* (PACHECO, 2010).

Os resultados obtidos pelo presente estudo na estratégia *in vitro* demonstra alterações nas expressões de alguns genes codificadores de fatores sigma durante o crescimento bacteriano em Soro Fetal Bovino (Tabela 10). A expressão dos genes *sigE* e *sigK* foi reduzida, ao passo que na expressão dos genes *sigB*, *sigC*, *sigH*, e *sigM* não houve alteração significativa, e apenas o gene *sigD* esboçou um aumento na expressão significativa. Castro (2009) demonstrou que a expressão do gene *sigD* só foi significativamente elevada após 270 min de exposição à plumbagina (substância empregada para a geração de estresse oxidativo), período que a cultura se aproxima da transição para a fase estacionária. Porém há relatos de que este gene seja importante para a fase lag de crescimento bacteriano (RAMAN et al., 2004), a qual não foi contemplada pelos experimentos de análise da expressão diferencial realizados pelo presente trabalho, onde a expressão aumentada do *sigD* foi observada durante a fase exponencial de crescimento.

Após análise da expressão diferencial dos genes codificadores de fatores sigma com diferentes genes normalizadores foi possível observar, que apenas o gene *sigD*, apresentou níveis transcricionais mais elevados nessa condição estudada (Figura 19), corroborando os resultados obtidos com o normalizador *sigA*. Com utilização dos normalizadores *16s rDNA*, *atpA*, *efp*, *fusA* e *rpoC*, foi observado uma maior taxa de aumento na expressão do gene *sigD*, sendo os valores respectivamente de 2,0; 2,3; 2,1; 2,4; 2,8 vezes mais expresso. Porém na normalização com o gene que foi indicado como melhor gene normalizador pelo NormFinder, o *gyrA*, não foram observados alterações significativas na expressão do *sigD* (Tabela 11), mas quando este gene foi utilizado associado a outro normalizador, gene *fusA*, como sugerido pelo NormFinder (*gyrA* + *fusA*), foi observado aumento de 1,6 vezes na expressão gênica do fator SigD.

No estudo de Pinto e colaboradores (2014) investigaram o perfil transcricional da linhagem 1002 da *C. pseudotuberculosis* sob condições que simulam o ambiente no hospedeiro, estresse osmótico, ácido e térmico através do sequenciamento dos transcritos. Sendo possível detectar alterações na expressão de vários genes codificadores de fatores *sigma*, o gene *sigH* foi induzido nas três condições estudadas e os genes *sigA*, *sigB* e *sigD* foram induzidos no estresse osmótico e térmico, os outros fatores *sigma* foram significativos em uma ou duas condições. Um estudo envolvendo mutação no gene *sigD* em *M. tuberculosis* (CALAMITA et al., 2005) revelou que o mutante produz atraso no tempo de morte dos camundongos, capacidade de replicação e persistência nos pulmões e exibiu a mesma taxa de crescimento da linhagem selvagem nos macrófagos, assim sendo possível concluir que o sigma D é dispensável ao crescimento *in vitro*, crescimento em macrófagos e crescimento e sobrevivência em camundongos.

Os resultados deste estudo demonstram que o fator *sigD* é ativado durante crescimento de *C. pseudotuberculosis* na presença de soro fetal bovino, Porém, novas investigações são necessárias para confirmar a função desempenhada por este regulador transcricional na expressão gênica global e na resistência ao estresse em *C. pseudotuberculosis*

Raman e colaboradores (2004) identificaram genes regulados por SigD em *Mycobacterium tuberculosis*, através de uma análise de transcrição de todo o genoma utilizando a tecnologia de microarranjos para comparar os perfis de transcrição da linhagem selvagem H37Rv e uma linhagem mutante para o gene *sigD* de *M. tuberculosis*. Esta comparação da transcrição nestas duas linhagens revelou que 206 genes apresentaram uma expressão aumentada na linhagem selvagem em relação a mutante. Dentre estes, 47 genes tiveram sua expressão em torno de 1,7 vezes mais expressa na linhagem selvagem do que na mutante para o *sigD*, sugerindo assim que esses genes são regulados pelo fator SigD.

Estes genes descritos por Raman e colaboradores (2004) como genes regulados pelo fator *sigD* em *M. tuberculosis*, foram mapeados contra o genoma de *C. pseudotuberculosis*, e 18 genes, *sigD*, *rpfA*, *dnaK*, *grpE*, *grpE*, *groEL2*, *groEL1*, *groES*, *fadD15*, *trxA1*, *soda*, *cpfr\_01097*, *cpfr\_01207*, *Cp3995\_0581*, *cmtB*, *fadD32*, *Cp316\_0721*, *lipY*, apresentaram parâmetro de confiabilidade (E value < 10<sup>-4</sup>), além de cobertura de sequência e similaridade satisfatórias (Tabela 12). Seis desses genes são genes responsáveis por regular a expressão de genes associados a resposta ao choque térmico, como as proteínas chaperonas, assim como

mostrado por (RAMAN, 2004) em *M. tuberculosis*, demonstrando assim a importância desse fator sigma na resposta ao choque térmico. Os resultados do estudo de Calamita e colaboradores (2005) mostraram que SigD regula um conjunto de genes envolvidos com a síntese de proteínas ribossômicas cuja expressão é, normalmente, induzida durante a fase estacionária, *in vitro*. Comprovando assim a importância do fator SigD, sendo possivelmente importante para o processo da infecção em ovinos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da estabilidade de expressão de oito genes candidatos a normalizadores para estudos de qRT-PCR, sugere os genes *gyrA* e *fusA* mais adequados para estudos com *C. pseudotuberculosis*. Porém os genes *dnaG*, *rpoC*, *gyrB*, *efp*, *rpoB*, e *atpA* também podem ser utilizados como genes normalizadores. Esta investigação fornece um conjunto validado de genes de referência para o estudo da expressão do gene de *C. pseudotuberculosis* em condições biológicas típicas e um ponto inicial de partida para explorar novas configurações experimentais neste microorganismo. A informação também pode ser de grande valor para futuros experimentos análises transcricionais em outros sistemas bacterianos. Porém o presente trabalho reforça a importância da avaliação e validação prévia de genes normalizadores nas condições experimentais de interesse.

Foram observadas alterações nas expressões de vários genes codificadores de fatores sigma nas condições estudadas, o gene codificador do fator SigD foi o que apresentou maior ativação durante o crescimento bacteriano em Soro Fetal Bovino, o meio que simula o ambiente do hospedeiro. Após a predição de genes regulados pelo fator SigD foi possível observar que este regula a expressão de genes associados a resposta ao choque térmico, como as proteínas chaperonas, comprovando assim a importância deste fator para o processo da infecção em ovinos. Novos estudos serão necessários para entendermos melhor a função desempenhada por este regulador transcricional na expressão gênica global e na resistência ao estresse em *C. pseudotuberculosis*

## 8 REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, v. 64, p. 5245–5250, 2004.
- ARSENAULT, J.O.; GIRARD, C. ; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D. O.; GALARNEAU, J.R.; BOISCLAIR, J., SIMARD, C.; BELANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.*, v. 59, p. 67–81, 2003.
- BAIRD, G.J.; FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its Role in Ovine Caseous Lymphadenitis. *J. Comp. Path.*, v.137, p.179-210. 2007.
- BASHYAM, M.D.; HASNAIN, S.E. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. *Infect. Gen. Evol.*, v. 4, p. 301-308. 2004.
- BASTOS, B.L.; MEYER, R.; GUIMARÃES, J.E.; AYRES, M.C.; GUEDES, M.T.; MOURA-COSTA, L.F.; BURGHGRAVE, U.S.; SENA, L.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R.W. Haptoglobin and fibrinogen concentrations and leukocyte counts in the clinical investigation of caseous lymphadenitis in sheep. *Vet. Clin. Pathol.* v. 40, p.496-503, 2011.
- BASTOS, B.L.; LOUREIRO, D.; RAYNAL, J.T.; GUEDES, M.T.; VALE, L.C.; MOURA-COSTA, L.F.; GUIMARÃES, J.E.; AZEVEDO, V.; PORTELA, R.W. MEYER, R. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. *BMC Veterinary Research*. 9:254, 2013.
- BILLINGTON, S.J.; ESMAY, P.A.; SONGER, J.G.; JOST, B.H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 208, p. 41-45, 2002.
- BOLT, F.; CASSIDAY, P.; TONDELLA, M.L.; DEZOYSA, A.; EFSTRATIOU, A.; SING, A.; ZASADA, A., et al. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of *Corynebacterium diphtheria*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 11, p. 4177–4185, 2010.
- BROWNING, D.F.; BUSBY, S.J.W. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Micro* v. 2, p. 57-65, 2004.

- CALAMITA, H.; KO, C.; TYAGI, S.; YOSHIMATSU, T.; MORRISON, N.E.; BISHAI, W.R. The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence. *Cell Microbiol.* v.7, n.2, p.233-244, 2005.
- CARNE, H.R. The toxin of *Corynebacterium ovis*. *J. Path. Bact.*, v. 51, p. 199-212, 1940.
- CARVALHO, D.M.; CASTRO, T.L.P.; SANTOS, C.S.; CARVALHO, R.D.; BASTOS, B.; BAGANO, P.; MEYER, R.; AZEVEDO, V.; PACHECO, L.G.C. Expressao Diferencial de Reguladores Transcricionais da Bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* Durante Contato com Fatores do Hospedeiro. *Diálogos e Ciência*, n.33, 2013.
- CASTRO, T. *Avaliação da expressão diferencial de genes codificadores de fatores sigma de Corynebacterium pseudotuberculosis em resposta a agentes geradores de estresse oxidativo.* Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.
- CHARLET, D.; MOSTOWY, S.; ALEXANDER, D.; SIT, L.; WIKER, H.G.; BEHR, M.A. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK. *Mol. Microbiol.*, v. 56, p. 1302–1313, 2005.
- CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMAN, T.; UDVARDI M.K.; SCHEIBLE W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* v.139, p.5–17, 2005.
- DAHL, J.L.; KRAUS, C.N.; BOSHOFF, H.I.; DOAN, B.; FOLEY, K.; AVARBOCK, D.; KAPLAN, G.; MIZRAHI, V.; RUBIN, H.; BARRY, C.E. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* v.100, p.10026–10031, 2003.
- DINARELLO, C.A. An interleukin – 1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *The New England Journal of Medicine*, v.311, n.22, p.1413- 1418,1984.
- DOMINGUETI, C.P. *Análise do papel do fator sigma C na resposta de Corynebacterium pseudotuberculosis a diferentes condições de estresse ambiental.* - Dissertação (Mestrado em Genética)- Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet. Res.* v.37, p. 201-218, 2006a.

DORELLA, F.A.; ESTEVAM, E.M.; PACHECO, L.G.C.; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.P.; GOMES, E.A; BARSANTE, M.M.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl. Environm. Microbiol.* v.72, p. 7368-7372, 2006b.

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

DOW, J. M.; DANIELS, M.J. Xylella genomics and bacterial pathogenicity to plants. v.17, p. 263-271, 2000.

ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G. Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, v. 12, p.169-178,1988.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8:131, 2008.

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

GACHON, C.; MINGAN, A; CHARRIER, B. Real time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot* v.55, p.1445-1454, 2004.

GRUBER, T. M.; GROSS, C. A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology* v.57, p. 441-466, 2003.

GUÉNIN, S.; MAURIA, T.M.; PELLOUX, J.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BELLINI, C.; GUTIERREZ, L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* v.60, p.487-493, 2009.

HALGASOVA, N.; BUKOVSKA, G.; UGORCAKOVA, J.; TIMKO, J.; KORMANEC, J. The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 216, p. 77-84, 2002.

HELMANN, J.D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb.*

*Physiol.*, v. 46, p. 47-110, 2002.

HODGSON, A.L.; BIRD, P.; NISBET, I.T. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.*, v. 172, p. 1256-1261, 1990.

HODGSON, A.L.M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; RADFORD, A.J. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.*, v. 60, p.2900–2905, 1992.

HODGSON, A.L.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; McCOLL, M.; CAMERON, A. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, v. 17, p. 802–808, 1999.

HU, Y.; COATES, A.R. Increased levels of sigJ mRNA in late stationary phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis* detected by DNA array hybridisation. *FEMS Microbiol Lett* v.202, p. 59–65, 2001.

JONGE, H.J.M.; FEHRMANN, R.S.N.; DE BONT E.S.J.M.; HOFSTRA, R.M.W.; GERBENS, F. *et al.* Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS ONE* v.898 n.2(9), 2007

JORDAN, S.; HUTCHINGS, M.I.; MASCHER, T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 32, p. 107-146, 2008.

KAUSHAL, D.; SCHROEDER, B.G.; TYAGI, S.; YOSHIMATSU, T. *et al.* Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc Natl Acad Sci USA* v.99, p.8330–8335, 2002.

KAZMIERCZAK, M.J.; WIEDMANN, M.; BOOR KJ. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v. 69, p. 527-43, 2005.

KOSTRO, K.; JAROSZ, L.; GRUSZECKI, T.; JUNKUSZEW, A.; LIPECKA, C. Utility of haptoglobin assay for sheep welfare and health status evaluation in pre- and postslaughter period. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* v.53, p.111-116, 2009.

LEAMASTER, B.R.; SHEN, D.T.; GORHAM, J.R.; LEATHERS, C.W.; WELLS, H.D. Efficacy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterin for the immunologic protection of sheep against development of caseous lymphadenitis, *Am. J. Vet. Res.* v.48, p. 869-872, 1987.



- LIU, J.; TAN, Y.; YANG, X.; CHEN, X.; LI, F. Evaluation of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 reference genes in gene expression studies by qRT-PCR. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.116, n.4, p.460-464, 2013.
- LIU, D.T.; CHAN, W.M.; FAN, D.S.; LAM, D.S. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Br. J. Ophthalmol.* v.89, p. 245–246, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *MET.* v. 25, p. 402–408, 2001.
- MAGNUSSON, L.U.; FAREWELL, A.; NYSTROM, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* v.13, p.236–242, 2005.
- MANGANELLI, R.; DUBNAU, E; TYAGI, S.; KRAMER, F.R.; SMITH, I. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* v. 31, p. 715-24, 1999.
- MANGANELLI, R.; VOSKUIL, M.I.; SCHOOLNIK, G.K.; SMITH, I. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol.* v.41, n.2, p.423-437, 2001.
- MANGANELLI, R.; VOSKUIL, M.I.; SCHOOLNIK, G.K.; DUBNAU, E.; GOMEZ, M.; SMITH, I. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor  $\sigma H$  in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol. Microbiol.* v.45, p.365-374, 2002.
- MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiol.* v. 153, p. 2203-2211, 2007a.
- MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: the major virulence factor, phospholipase D, is downregulated at 43 degrees. *C. Res. Microbiol.* v.158, p. 279-286, 2007b.
- MOORE, R.J.; ROTHEL, L.; KRYWULT, J.; RADFORD, A.J.; LUND, K.L.; HODGSON, A.L.M. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine* v.18, p.487–497, 2000.
- MOORE, R.; MIYOSHI, A.; PACHECO, L.G.C.; SEYFFERT, N.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium* and *Arcanobacterium* in: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition, Wiley-Blackwell, Oxford, UK. , 2010.

MOURA-COSTA, L. F. de. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. *R. Ci. Méd. Biol.* Salvador, v. 1, n. 1, p. 105-115, 2002.

NAKUNST, D., LARISCH, C., HUSER, A. T., TAUCH, A., PUHLER, A., KALINOWSKI, J. The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *J Bacteriol.* v.189, n.13, p.4696-4707, 2007.

NESVERA, J.; PATEK, M. Plasmids and promoters in Corynebacteria and their applications. In: BURKOVSKI, A. Corynebacteria: genomics and molecular biology. *United Kingdom: Caister Academic Press.* p. 113-154, 2008.

NEWTON FOOT, M.; GEY VAN PITTIUS, N. C. The complex architecture of mycobacterial promoters. *Tuberculosis* v.93, p.60-74, 2013.

PACHECO, L.G.C. *Caracterização do exoproteoma basal e variante de Corynebacterium pseudotuberculosis e a relação com a virulência reduzida de uma linhagem mutante para um fator sigma alternativo.* Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

PACHECO, L. G., CASTRO, T. L., CARVALHO, R. D., MORAES, P. M., DORELLA, F. A., CARVALHO, N. B., SLADE, S. E., SCRIVENS, J. H., FEELISCH, M., MEYER, R., MIYOSHI, A., OLIVEIRA, S. C., DOWSON, C. G., AZEVEDO V. A. A role for sigma factor SigE in *Corynebacterium pseudotuberculosis* resistance to nitric oxide/ peroxide stress. *Front. Microbio.* v.3, p.126, 2012.

PANDO, R.H.; AGUILAR, L.D.; SMITH, I.A.; MANGANELLI, R. et al. Immunogenicity and Protection Induced by a *Mycobacterium tuberculosis sigE* Mutant in a BALB/c Mouse Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infection and Immunity*, v.78, n.7, p.3168-3176, 2010.

PATON, M.W.; WALKER, S.B.; ROSE, I.R.; WATT, G.F. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.*, v. 81, p. 91–95. 2003.

PINTO, A. C. *Análise em larga escala da expressão diferencial de Corynebacterium pseudotuberculosis em resposta a estresses abióticos.* Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, p.1-214, 2011.

PINTO, A.C.; RAMOS, R.T.; SILVA, W.M.; ROCHA, F.S.; BARBOSA, S.; MIYOSHI, A.; SCHNEIDER, M.P.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. The core stimulon of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain 1002 identified using ab initio methodologies. *Integr Biol (Camb)*. v.4, n.7, p.789-794, 2012.

PINTO, A.C.; SÁ, P.H.C.G.; RAMOS, R.T.; BARBOSA, S.; BARBOSA, H.P.M.; MIYOSHI, A.; SCHNEIDER, M.P.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. et al. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMG Genomics*. 15:14, 2014.

POTVIN, E.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R.C. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*. v. 32, p. 38-55, 2008.

RAIVIO, T.L.; SILHAVY, T.J. Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 591-624, 2001.

RAMAN, S.; HAZRA, R.; DASCHER, C.C.; HUSSON, R.N. Transcription Regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* Alternative Sigma Factor SigD and Its Role in Virulence. *J. Bacteriol.*, v. 186, p. 6605–6616, 2004.

RASMUSSEN, R.P. Quantification on the Light Cycler. In: Meuer S, Wittwer CT and Nakagawara K (eds) *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. 1st edition. Springer Press, Heidelberg, p. 21-34, 2001.

RIBEIRO, M.G.; JÚNIOR, J.G.D.; PAES, A.C.; BARBOSA, P.G. et al. Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina. *Arq Inst Biol* v.68, p. 23–28, 2001.

ROBINSON, M.D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology*, v. 11, p. R25, 2010.

RODRIGUE, S.; PROVVEDI, R.; JACQUES, P.E.; GAUDREAU, L.; MANGANELLI, R. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 30, p. 926 - 941, 2006.

ROHDE, K.; YATES, R.M.; PURDY, G.E.; RUSSELL, D.G. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol. Rev*. v. 219, p. 37-54, 2007.

RUIZ, J.C.; D'AFONSECA, V.; SILVA, A.; ALI, A.; PINTO, A.C.; SANTOS, A.R.; ROCHA, A.A.; LOPES, D.O.; DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G. et al. Evidence for

reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS One*. 18;6(4):e 18551, 2011.

SACHDEVA, P.; MISRA, R.; TYIAGI, A.K.; SINGH, Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.*, v. 277, p. 605-626, 2009.

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

SCHAIBLE, U.E.; HAAS, A. *Mycobacterium tuberculosis* and His Comrades. In *Intracellular niches of microbes*. Wiley-Blackwell. 2009.

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

SEYFFERT, N.; GUIMARAES, A.S.; PACHECO, L.G.; PORTELA, R.W.; BASTOS, B.L.; DORELLA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; GOUVEIA, A.M.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted protein-based ELISA. *Res. Vet. Sci.* v. 88, p. 50-55, 2010.

SIMMONS, C.P.; HODGSON, A.L.M.; STRUGNELL, R.A. Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, v.65, p3048- 3056, 1997.

SIMMONS, C.P.; DUNSTAN, S.J.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; HODGSON, A.L.; STRUGNELL R.A. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*, v.66, p.474–479, 1998.

SMITH, I.; PANDO, R.H.; MANGANELLHI, P. University of medicine and dentistry of New Jersey. Attenuated Mycobacterial strain as novel vaccine against tuberculosis. US 2013/0101623 A1, 25 abril 2013.

SOARES, S.C.; SILVA, A.; TROST, E.; BLOM, J.; RAMOS, R.; et al. The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar *ovis* and *equi* strains. *Plos One*, v.8, p.e53818, 2013.

SONGER, J.G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M.M.; OLSON, G.B.; KELLEY, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, p. 223–226, 1988.

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

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

STAROŃ, A.; SOFIA, H.J.; DIETRICH, S.; ULRICH, L.E.; LIESEGANG, H.; MASCHER, T. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol. Microbiol.* v.74, p. 557-581, 2009.

STEFANSKA, I.; GIERYNSKA, M.; RZEWUSKA, M.; ANDBINEK, M. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. *Pol.J.Vet.Sci.* v.13, p. 143–149, 2010.

SUHREN, G.; WALTE, H.G. First experiences with automation flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. *Milchwissenschaft*, v.50, v.3, p. 249 – 275, 1999.

SUPPLY, P.; MARCEAU, M.; MANGENOT, S.; ROCHE, D.; ROUANET, C.; KHANNA, V. *et al.* Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Genetics* v.45, n.2 p:172–179, 2013.

TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; MOORE, R.J.; HODGSON, A.L.M. Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine* v.13, p.1785–1792, 1995.

TAYLOR, W.E.; STRAUS, D.B.; GROSSMAN, A.D.; BURTON, Z.F.; GROSS, C.A.; BURGESS, R.R. Transcription from a heat-inducible promoter causes heat shock regulation of the sigma subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Cell.* v.38, n.2, p.371-381, 1984.

TAYLOR, S.C.; MRKUSICH, E.M. The State of RT-Quantitative PCR: Firsthand Observations of Implementation of Minimum Information for the Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) *J Mol Microbiol Biotechnol* v. 24, p. 46-52, 2014.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B.A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN M.J.; SALZBERG, S.L.; WOLD, B.J.; PACHTER, L. Transcript assembly and

quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology* v. 28 p. 511–515, 2010.

TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, v. 7, p. 562–578, 2012.

TROST, E., et al. The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights in to gene- regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics* 11, 728, 2010.

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

WÖSTEN, M.M.S.M. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 22, p.127-150, 1998.

YOSHIMURA, M.; ASAI, K.; SADAIE, Y.; YOSHIKAWA, H. Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology* v.150, p. 591-599, 2004.