



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**ISOLAMENTO, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO GENE *hsp60* DE
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS E
SUA UTILIZAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DE UMA
VACINA DE DNA E DE SUBUNIDADE PROTÉICA**

KEILA DA SILVA COELHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Belo Horizonte – MG

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

KEILA DA SILVA COELHO

**ISOLAMENTO, CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO GENE *hsp60* DE
CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS E
SUA UTILIZAÇÃO NA CONSTRUÇÃO DE UMA
VACINA DE DNA E DE SUBUNIDADE PROTÉICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientação: Dr. Vasco Azevedo
Co-Orientador: Anderson Miyoshi

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte, 2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) e no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas LIDI). Ambos pertencem ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e estão sob a orientação dos professores Dr. Vasco Azevedo e Dr. Sérgio Costa, respectivamente. Este trabalho ainda teve como colaborador o professor Dr. Roberto Meyer e sua equipe do Laboratório de Imunologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e teve o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) do Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família: meu pai Valdeci, minha mãe Valdinólia, minhas irmãs Liliane e Hadrienne, a meu cunhado Jean e a meu namorado Adriano. Dedico também a todos os meus amigos que estiveram ao meu lado e me apoiaram durante a realização do mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos e por ter iluminado meus caminhos, sempre me dando força e garra.

Ao professor Dr. Vasco Azevedo, pela oportunidade, orientação e apoio.

Ao Professor Dr Anderson Miyoshi, pela co-orientação, apoio e disponibilidade a esclarecimentos científicos.

À Dr. Cristina Toscano, pela dedicação, pelo empenho e treinamento na área de Imunologia, além do acompanhamento e disponibilidade à esclarecimentos científicos.

Aos grupos de pesquisa dos doutores Sérgio Costa (UFMG) e Roberto Meyer (UFBA), pela disponibilidade de material e cooperação científica.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Celular e Molecular, especialmente: Clarissa Rocha, Fernanda Dorella, Guilherme Augusto, Kátia Leite, Luis Pacheco, Marcelle Almeida, Paula Gonçalves, Ricardo Rabelo, Thiago Castro, Valéria Dellaretti e Vivian D'Afonseca, pela ajuda, apoio e críticas construtivas a este trabalho de dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, especialmente Cyntia, Fernanda, Gilson, Júlia, Michele, Natália e Teresa, pelo apoio e ajuda nos experimentos.

Ao meu amigo e professor Dr. Marcos Bryan, pela amizade, apoio, disponibilidade e orientação pessoal e profissional.

À minha amiga e irmã por consideração, Daiane, pela amizade e apoio em todos os momentos da minha vida pessoal e profissional.

Ao funcionário Darci, pela ajuda em todos os momentos e pela amizade.

Um agradecimento especial aos meus pais pelo exemplo de vida e por acreditarem e me incentivarem a perseguir os meus objetivos, estando sempre a meu lado em qualquer momento. A eles, devo tudo.

Às minhas irmãs Liliane e Hadrienne, a meu cunhado Jean e a meu namorado Adriano, pelo amor, carinho e dedicação.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XVI
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Introdução Geral	2
1.2. Estrutura do manuscrito	5
1.3. Revisão da literatura	6
1.3.1. Classificação do gênero <i>Corynebacterium</i>	6
1.3.2. Estrutura genômica comparativa de <i>Corynebacterium</i>	7
1.3.3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	9
1.3.3.1. Aspectos microbiológicos.....	9
1.3.3.2. Propriedades Bioquímicas.....	10
1.3.3.3. Susceptibilidade antimicrobiana.....	10
1.3.3.4. Taxonomia.....	11
1.3.3.5. Aspectos gerais da infecção por <i>C. pseudotuberculosis</i>	12
1.3.3.5.1. Transmissão.....	12
1.3.3.5.2. Casos em Humanos.....	13
1.3.4. Linfadenite Caseosa.....	14
1.3.4.1. Epidemiologia da LC.....	14
1.3.4.2. Determinantes da virulência de <i>C. pseudotuberculosis</i>	15

1.3.4.2.1. Fosfolipase D.....	16
1.3.4.2.2. Lipídeos tóxicos da parede celular.....	17
1.3.4.2.3. Patogenia e imunologia da LC.....	17
1.3.4.2.4. Tratamento.....	20
1.3.4.2.5. Controle.....	21
1.3.4.2.6. Vacinas.....	22
1.3.4.2.6.1. Vacinas comerciais.....	22
1.3.4.2.6.2. Vacinas de sub-unidade protéica e vacinas de DNA.....	23
1.3.4.2.6.3. Candidatos a antígenos vacinais.....	26
1.3.4.2.7. Proteínas do Choque Térmico.....	28
1.3.4.2.7.1. História e Características.....	28
1.3.4.2.7.2. Caracterização genética.....	28
1.3.4.2.7.3. Funções das Hsps.....	29
1.3.4.2.7.4. Hsps como antígenos vacinais.....	31
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo Geral.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1. Linhagens Bacterianas, Plasmídeos e Condições de Cultivo.....	38
3.2. Manipulação do DNA.....	40
3.3. Extração de DNA cromossômico.....	40
3.3.1. Resolução eletroforética.....	42

3.4. Isolamento e caracterização molecular do gene <i>hsp60</i>	42
3.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
3.4.2. Purificação do fragmento de DNA.....	43
3.4.3. Clonagem no vetor pTOPO.....	44
3.4.4. Transformação bacteriana.....	44
3.4.4.1. Confeção de <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	44
3.4.4.2. Transformação da <i>E. coli</i> TOP10.....	44
3.4.5. Verificação da presença e tamanho do inserto.....	45
3.4.5.1. Extração do DNA plasmidiano em pequena escala (Minipreparações).....	45
3.4.5.2. Confirmação da presença e do tamanho do inserto no vetor.....	46
3.4.6. Caracterização do gene <i>hsp60</i>	47
3.4.6.1. Reações de seqüenciamento.....	47
3.4.6.2. Busca de homologia em bancos de dados e análises <i>in silico</i>	47
3.5. Caracterização molecular do gene a jusante do gene <i>hsp60</i>	48
3.5.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	48
3.5.2. Caracterização do gene <i>hsp10</i>	49
3.5.2.1. Purificação dos produtos de PCR.....	49
3.5.2.2. Reações de Seqüenciamento e análises <i>in silico</i>	50
3.6. Clonagem do gene <i>hsp60</i> em vetor de expressão procarioto.....	50
3.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	50
3.6.2. Purificação do fragmento de DNA.....	51
3.6.3. Clonagem em vetor pTOPO.....	52
3.6.4. Transformação em <i>E. coli</i> TOP10.....	52

3.6.5. Sub-clonagem no vetor de expressão procarioto.....	52
3.6.5.1. Digestão enzimática.....	52
3.6.5.2. Purificação dos fragmentos de DNA.....	52
3.6.5.3. Clonagem da seqüência codificadora do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> nos vetores de expressão procarioto.....	53
3.6.5.4. Verificação da presença e tamanho dos insertos dos clones referentes aos plasmídeos recombinantes pProEx-Hta: <i>hsp60</i>	53
3.7. Expressão e Purificação da Proteína Hsp60 Recombinante.....	53
3.7.1. Expressão da Proteína Hsp60 Recombinante.....	53
3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	54
3.7.3. Isolamento da proteína recombinante Hsp60.....	55
3.7.3.1. Preparo da amostra para a purificação - lise e dosagem.....	55
3.7.3.1.2. Purificação da proteína recombinante Hsp60.....	56
3.7.3.1.3. Diálise da proteína recombinante Hsp60.....	56
3.8. Caracterização funcional da proteína recombinante Hsp60.....	56
3.9. Imunizações com a proteína recombinante Hsp60.....	57
3.9.1. Animais.....	57
3.9.2. Coleta de sangue.....	58
3.9.3. Desafio e Infecção dos Animais.....	58
3.9.4. Caracterização da Resposta Imunológica.....	59
3.9.4.1. Caracterização do Perfil da Resposta Humoral.....	59
3.9.4.1.1. Detecção de imunoglobulinas anti-Hsp60 a partir das amostras de soro dos animais imunizados com a proteína recombinante e de caprinos infectados experimentalmente.....	59

3.9.4.1.2. Análises estatísticas.....	60
3.9.4.2. Caracterização do perfil da resposta celular.....	60
3.9.4.2.1. Cultura de esplenócitos.....	60
3.9.4.2.2. Detecção de citocinas.....	62
3.9.5. Análise da proteção.....	62
3.10. Clonagem do gene <i>hsp60</i> em vetor de expressão eucarioto.....	62
3.4.10.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	62
3.10.2. Purificação do fragmento de DNA.....	64
3.10.3. Clonagem em vetor pTOPO.....	64
3.10.4. Transformação em <i>E. coli</i> TOP10.....	64
3.10.5. Sub-clonagem no vetor de expressão eucarioto.....	64
3.10.5.1. Digestão enzimática.....	64
3.10.5.2. Purificação dos fragmentos de DNA.....	65
3.10.5.3. Clonagem da seqüência codificadora do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> nos vetores de expressão eucarioto.....	65
3.10.5.4. Verificação da presença e tamanho dos insertos dos clones referentes aos plasmídeos recombinantes pVAX1: <i>hsp60</i>	65
3.10.6. Isolamento e purificação dos vetores utilizados na imunização gênica.....	65
3.11. Imunização com a vacina de DNA.....	66
3.11.1. Animais.....	66
3.11.2. Imunização.....	66
3.11.3. Coleta de sangue.....	66
3.11.4. Desafio e infecção dos Animais.....	67
3.11.5. Caracterização da Resposta Imunológica.....	67

3.11.5.1. Caracterização do perfil da resposta humoral.....	67
3.11.5.1.1. Detecção de imunoglobulinas anti-Hsp60.....	67
3.11.5.2. Análises estatísticas.....	67
3.11.6. Análise da proteção.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1. PARTE 1	
Isolamento, clonagem e caracterização molecular do gene <i>hsp60</i> e do seu operon.....	69
4.1.1. Isolamento e clonagem do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	70
4.1.2. Caracterização molecular do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> através da técnica de seqüenciamento e por análises <i>in silico</i>	71
4.1.3. Isolamento do gene <i>hsp10</i>	84
4.4. Caracterização molecular do gene <i>hsp10</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> através da técnica de seqüenciamento e análises <i>in silico</i> para confirmar a organização em operon do gene <i>hsp60</i>	85
4.2. PARTE 2	
Desenvolvimento de uma vacina de subunidade protéica.....	91
4.2.1. Clonagem do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> no vetor de expressão procarioto (pProEx-Hta).....	92
4.2.1.1. Clonagem do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> no vetor pTOPO:Blunt.....	92

4.2.1.2. Sub-clonagem do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> no vetor de expressão procarioto (pProEx-Hta).....	93
4.2.2. Expressão e purificação da proteína Hsp60 recombinante.....	95
4.2.2.1. Expressão piloto da proteína recombinante Hsp60 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	95
4.2.2.2. Expressão da proteína recombinante Hsp60 em maior escala.....	96
4.2.2.3. Purificação e diálise da proteína recombinante Hsp60.....	97
4.2.3. Caracterização funcional da proteína Hsp60.....	99
4.2.4. Avaliação do isótipo IgG anti-rHsp60 a partir de soro de caprinos infectados com linhagem selvagem de <i>C. pseudotuberculosis</i>	105
4.2.5. Avaliação da resposta imunológica conferida pela imunização com rHsp60.....	109
4.2.5.1. Avaliação do perfil de resposta humoral induzida pela imunização com rHsp60.....	110
4.2.5.2. Avaliação da resposta celular.....	113
4.2.5.3. Avaliação da proteção dos animais imunizados com rHsp60.....	121

4.3. PARTE 3

Desenvolvimento da vacina de DNA baseada no gene *hsp60* de

<i>C. pseudotuberculosis</i>	123
4.3.1. Clonagem do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> no vetor de expressão eucarioto (pVAX-1).....	124
4.3.1.1. Clonagem do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> no vetor pTOPO:Blunt.....	124

4.3.1.2. Sub-clonagem do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> no vetor de expressão eucarioto (pVAX1).....	125
4.3.1.3. Produção e purificação dos vetores pVAX1 e pVAX1: <i>hsp60</i> a serem utilizados como vacina de DNA.....	128
4.3.2. Imunização com a vacina de DNA.....	129
4.3.2.1. Avaliação do perfil de reposta humoral induzida pela imunização com a vacina de DNA em modelo murino.....	130
4.3.2.3. Análise da proteção dos animais imunizados com a vacina de DNA.....	133
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	137
5.1. Conclusões.....	138
5.2. Perspectivas.....	140
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

AcK	Acetato de potássio
BHI	Infusão Cérebro-Coração
CFA	Adjuvante completo de Freund
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
DO _{600nm}	Densidade ótica em comprimento de onda de 600 nanômetros
EDTA	Etileno diamino tetra-acetato dissódio
ELISA	Ensaio de absorção imunoenzimático
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Hsps	“ <i>heat shock proteins</i> ” – proteínas do choque térmico
IFA	Adjuvante incompleto de Freund
INF- γ	interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina IgG1
IgG2a	Imunoglobulina IgG2a
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobases (10^3 pb)
KCl	Cloreto de potássio

KDa	quilodaltons (10^3 Da)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
M	Molar
MA	Miliamper
mg	Miligrama
MgCl_2	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	milimolar
NaAc	Acetato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH_2PO_4	Fosfato monobásico de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dibásico de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
OPD	Orto-fenilenodiamina
Pb	Par de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T20	Tampão salina fosfato acrescido de Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol

PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
Rnase	Ribonuclease A
rpm	Rotações por minuto
Sarcosil	Sódio-N-lauroilsarcosina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc	Linfócitos T citotóxicos
Th1	Células T auxiliares do tipo 1
Th2	Células T auxiliares do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônia
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosideo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Associação entre chaperonina e co-chaperonina.....	31
Figura 2: Amplificação do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	70
Figura 3: Seqüência nucleotídica do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	71
Figura 4: Resultados dos alinhamentos de maior similaridade em forma de gráfico (A) e tabelas com suas informações respectivas geradas automaticamente pelo BLASTn (B).....	73
Figura 5: Seqüência de aminoácidos do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> ..	74
Figura 6: Resultados dos alinhamentos de maior similaridade em forma de gráfico (A) e tabelas com suas informações respectivas geradas automaticamente pelo BLASTx (B).....	75
Figura 7: Matrix de identidade entre a proteína Hsp60 de espécies do grupo CMN.....	77
Figura 8: Alinhamento das seqüências de HSP60 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	79
Figura 9: Repetições de histidina presentes na porção C-terminal da proteína Hsp60 de actinomicetos cópia 1.....	78
Figura 10: Motivos GGM presentes na porção C-terminal da proteína Hsp60 de actinomicetos cópia 2.....	80
Figura 11: Análise dos domínios conservados presentes na seqüência da Hsp60 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	81
Figura 12: Estrutura secundária da proteína Hsp60 de <i>C. pseudotuberculosis</i>	83
Figura 13: Modelagem da proteína Hsp60 de (A) <i>C. pseudotuberculosis</i> e de (B) <i>E. coli</i>	82
Figura 14: Amplificação do gene <i>hsp10</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	85

Figura 15: Seqüência nucleotídica do gene <i>hsp10</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	86
Figura 16: Resultados dos alinhamentos de maior similaridade em forma de gráfico (A) e tabelas com suas informações respectivas geradas automaticamente pelo BLASTn (B).....	87
Figura 17: Seqüência de aminoácidos do gene <i>hsp10</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	88
Figura 18: Resultados dos alinhamentos de maior similaridade em forma de gráfico (A) e tabelas com suas informações respectivas geradas automaticamente pelo BLASTx (B)	89
Figura 19: Amplificação do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizando os iniciadores com os sítios de restrição para posterior clonagem direcional no vetor de expressão procarioto pProEx-Hta.....	93
Figura 20: Mapa do vetor pProEx-Hta.....	94
Figura 21: Cinética da expressão da proteína recombinante utilizando 0,6 mM de IPTG.....	95
Figura 22: Expressão da proteína recombinante após a indução com 1 mM de IPTG.....	96
Figura 23: Análise das frações solúveis e insolúveis da cultura de 500 ml induzida com 1 mM de IPTG.....	97
Figura 24: Comparação entre as frações solúveis e insolúveis da cultura de 500 ml induzida com 1 mM de IPTG antes e depois da purificação da proteína recombinante Hsp60.....	99
Figura 25: Teste de complementação gênica após estresse térmico.....	101

Figura 26: Tese de complementação utilizando como parâmetro o crescimento do fago λ clb2 em linhagens mutantes (groEL44) de <i>E. coli</i>	102
Figura 27: Expressão da proteína Hsp60 de <i>C. pseudotuberculosis</i> em linhagem mutante de <i>E. coli</i> para o gene <i>hsp60</i> (groEL44) transformada com o vetor pProEx: <i>hsp60</i>	103
Figura 28: (A): Produção do isótipo IgG em caprinos infectados com 10^6 com a linhagem virulenta de <i>C. pseudotuberculosis</i> e (B) Produção do isótipo IgG em caprinos infectados com 10^8 com a linhagem virulenta de <i>C. pseudotuberculosis</i>	107
Figura 29: Níveis de produção de (A) IgG, (B) IgG1 e (C) IgG2a anti-Hsp60 pelos camundongos imunizados com a proteína recombinante Hsp60 de <i>C. pseudotuberculosis</i> associada ao adjuvante de Freud.....	112
Figura 30: Perfil de citocinas dos camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante Hsp60 de <i>C. pseudotuberculosis</i> associada ao adjuvante de Freud.....	115
Figura 31: Amplificação do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> utilizando os iniciadores com os sítios de restrição para posterior clonagem direcional no vetor de expressão eucarioto pVAX1.....	125
Figura 32: Mapa do vetor pVAX1.....	127
Figura 33: Análise da extração e purificação em larga escala dos vetores pVAX1 e pVAX1: <i>hsp60</i>	128

Figura 34: Níveis de produção de (A) IgG, (B) IgG1 e (C) IgG2a anti-HSP60 pelos camundongos imunizados com a vacina de DNA baseada no gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	132
Figura 35: Animais imunizados com (A) pVAX1 e (B) pVAX1: <i>hsp60</i>	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais representantes do grupo CMN.....	8
Tabela 2: Linhagens bacterianas utilizadas.....	38
Tabela 3: Plasmídeos utilizados.....	39
Tabela 4: Parâmetros utilizados na PCR referentes à amplificação do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	43
Tabela 5: Parâmetros utilizados na PCR referentes à amplificação do gene <i>hsp10</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	49
Tabela 6: Parâmetros utilizados na PCR referentes ao vetor procarioto (pProEx-Hta).....	51
Tabela 7: Parâmetros utilizados na PCR referentes ao vetor eucarioto (pVAX1).	63
Tabela 8: Protocolos e imunizações com Hsp60.....	120

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), uma doença crônica que acomete os pequenos ruminantes. Esta patologia é caracterizada pelo desenvolvimento de abscessos que levam à perda na produção e descarte de produtos animais. Apesar da ampla distribuição mundial da LC e de intensas pesquisas laboratoriais, a imunoprofilaxia contra a *C. pseudotuberculosis* ainda não é eficaz na redução da incidência da doença. Uma das estratégias vacinais propostas e utilizadas para tentar resolver esta questão é a busca por antígenos candidatos baseada em estudos realizados com microrganismos filogeneticamente próximos. Testes vacinais com o antígeno Hsp65 (Hsps; *Heat Shock Proteins*) de *Mycobacterium leprae* demonstram que a potente resposta imunológica gerada após a imunização confere proteção após o desafio com *Mycobacterium tuberculosis*, que é uma bactéria cuja patogenia é muito semelhante a de *C. pseudotuberculosis*. Nesta dissertação, o gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foi isolado e caracterizado, a fim de ser utilizado na construção de vacinas de subunidade protéica e de DNA. As análises das seqüências revelaram que a fase de leitura aberta é composta de 1626 pb, codificando um polipeptídeo de 541 aminoácidos. Este gene está organizado em operon no genoma da *C. pseudotuberculosis*, o qual é composto também pelo gene *hsp10*, e apresenta uma repetição de histidinas na porção C-terminal. Estas são características da cópia 1 das proteínas Hsp60 de espécies do gênero *Corynebacterium*, que apresentam em geral 2 cópias do gene *hsp*. Para a construção das vacinas, a seqüência codificadora do gene *hsp60* foi clonada em vetores de expressão para procariotos (pProEx) e para mamíferos (pVAX1). Camundongos BALB/c foram então imunizados com a proteína purificada associada ao adjuvante de Freud ou com a vacina de DNA. Ambas as imunizações induziram níveis significativos de anticorpos: IgG, IgG1 e IgG2a. Os animais imunizados com rHsp60 produziram níveis altos de interleucina (IL)-10, o que sugere a indução de uma resposta reguladora. Após o desafio com 10^6 UFC de uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*, todos os animais vieram a óbito em duas semanas. Estes resultados em conjunto sugerem que o sistema profilático adotado falhou em gerar uma resposta imunológica celular efetora, necessária para a proteção contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is the etiological agent of caseous lymphadenitis (LC), a chronic small ruminants disease. This pathology is characterized by the abscess development which leads to production and discard losses of animal products. This disease has a broad world distribution and it has received intense laboratory research; however, there is no efficient available vaccine against this bacteria. One vacinal strategy that has been proposed and utilized to resolve this problem is the search for candidate antigens; this solution is based on studies with phylogenetic closed microorganisms. There are some vacinal tests with the Hsp65 (Hsps; *Heat Shock Proteins*) *Mycobacterium leprae* antigen. The immunization with it induces a potent immune response which confers protection to *Mycobacterium tuberculosis* challenge. The pathogenesis of this last bacteria is very similar to the *C. Pseudotuberculosis*. In this work, the *C. Pseudotuberculosis hsp60* gene was isolated and characterized in order to develop protein and DNA vaccines. Sequence analysis revealed an open reading frame of 1626 bp encoding a 541 amino acid polypeptide. This gene is organized in the *C. pseudotuberculosis* genome as an operon, which comprises another gene, the *hsp10*, and the Hsp60 protein has an histidine repetition at the C-terminal sequence. These are characteristics of the *Corynebacterium* genus number one copy Hsp60; normally, this genus has two copies of the *hsp60* gene. To construct the vaccines, the coding sequence of the *hsp60* gene was cloned in prokaryotic and mammalian expression vectors. Purified protein associated with Freund adjuvant and the *hsp60* based DNA vaccines were used to immunise BALB/c mice. Both recombinant protein-based vaccine and DNA vaccine induced significant production of IgG, IgG1 and IgG2a levels. The protein vaccine only induced the IL-10 production, which characterizes a regulatory response. All the animals died after the challenge with 10^6 UFC of a virulent *C. pseudotuberculosis* Pus 6 strain. The immunization with protein and DNA vaccine failed to protect possibly due to their inability to elicit an efficient cellular immune response, which is necessary to protect against *C. pseudotuberculosis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcK	Acetato de potássio
BHI	Infusão Cérebro-Coração
CFA	Adjuvante completo de Freund
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
DO _{600nm}	Densidade ótica em comprimento de onda de 600 nanômetros
EDTA	Etileno diamino tetra-acetato dissódio
ELISA	Ensaio de absorção imunoenzimático
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Hsps	“ <i>heat shock proteins</i> ” – proteínas do choque térmico
IFA	Adjuvante incompleto de Freund
INF- γ	interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina IgG1
IgG2a	Imunoglobulina IgG2a
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobases (10^3 pb)
KCl	Cloreto de potássio

KDa	quilodaltons (10^3 Da)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
M	Molar
MA	Miliamper
mg	Miligrama
MgCl_2	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	milimolar
NaAc	Acetato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH_2PO_4	Fosfato monobásico de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dibásico de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
OPD	Orto-fenilenodiamina
Pb	Par de bases
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T20	Tampão salina fosfato acrescido de Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol

PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
Rnase	Ribonuclease A
rpm	Rotações por minuto
Sarcosil	Sódio-N-lauroilsarcosina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tc	Linfócitos T citotóxicos
Th1	Células T auxiliares do tipo 1
Th2	Células T auxiliares do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônia
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosideo

1. INTRODUÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, causadora da linfadenite caseosa (LC) – mal do caroço – em pequenos ruminantes (Dorella *et al.*, 2006a). Essa doença contagiosa crônica se caracteriza pelo desenvolvimento de abscessos em nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos – a LC externa – e/ou em órgãos internos, tais como pulmões, rins, fígado e baço, caracterizando a LC visceral (Merchant e Packer, 1967, Piontkowski e Shivvers, 1998).

A LC é distribuída mundialmente e é prevalente em países com grande atividade de ovino e caprinocultura, tais como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá e Brasil (Williamson, 2001; Arsenault *et al.*, 2003; Paton *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006). No Brasil, os Estados da Região Nordeste são os mais afetados, em razão de possuírem a maior concentração de rebanhos ovinos e caprinos do país (Ribeiro *et al.*, 2001). Em Minas Gerais, apesar de ainda possuir um rebanho reduzido, 84,3% dos produtores relataram ter problemas com a patologia (Faria *et al.*, 2004).

A LC é associada com perdas econômicas consideráveis. Entre estas, incluem-se: a redução do peso de lã, carne e leite, menor eficiência reprodutiva dos animais infectados e condenação de carcaças e couro em abatedouros (Paton *et al.*, 1994, Arsenault *et al.*, 2003).

O tratamento consiste principalmente no uso de antibióticos (Stanford *et al.*, 1998). Contudo, esta terapia é de alto custo e não representa uma estratégia viável, uma vez que as drogas não penetram na cápsula dos abscessos (Alves e Pinheiro, 1997; Piontkowski & Shivvers, 1998; Williamson, 2001). Portanto, o

controle da LC é baseado em manejos cujo objetivo é o de evitar a disseminação bacteriana. Alguns autores sugerem até mesmo uma estratégia mais agressiva, envolvendo o abate de qualquer animal portador da infecção (Baird, 1997). A imunoprofilaxia seria então a estratégia de melhor custo-benefício para a prevenção da LC. Apesar de oferecerem certo grau de proteção, a eficácia das vacinas desenvolvidas até então ainda está aquém do desejado e a severidade das lesões são variáveis (LeaMaster *et al.*, 1987, Holstad, 1989; Brogden *et al.*, 1990; Ellis *et al.*, 1991; Eggleton *et al.*, 1991).

Em razão da necessidade de desenvolver vacinas protetoras e mais seguras, diferentes estratégias vêm sendo testadas como vacinas vivas recombinantes e vacinas de DNA em caprinos e ovinos (Chaplin *et al.*, 1999). Estas estratégias utilizam principalmente o gene da exotoxina fosfolipase D (PLD), o fator de virulência mais caracterizado da *C. pseudotuberculosis*. Apesar de este antígeno induzir uma proteção significativa contra o desafio por *C. pseudotuberculosis*, a eficácia ainda é variada. Observa-se a diminuição do número e do tamanho dos abscessos e ainda o fato de que alguns animais demonstram sinais clínicos de disseminação bacteriana (Ellis *et al.*, 1991; Paton *et al.*, 2003). Estas observações demonstram a necessidade de buscar candidatos a antígenos vacinais que permitam a indução de uma imunidade protetora ideal sem os problemas apresentados.

A busca por antígenos imunodominantes de *C. pseudotuberculosis* vem sendo realizada. Com este propósito, o uso de soro de animais infectados e a pesquisa a partir de seqüências genômicas e de análises *in silico* são estratégias promissoras. Dentro desta temática, há alguns anos nosso grupo tem se voltado

ao isolamento, identificação, clonagem e expressão de seqüências gênicas codificadoras de antígenos de *C. pseudotuberculosis* que poderão contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos utilizados por este microrganismo para interagir, sobreviver e causar danos ao hospedeiro. Mais recentemente, nosso grupo, com o apoio da FAPEMIG e em associação com a Rede Genoma do Estado de Minas Gerais, deu início ao seqüenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis*. Este Projeto ainda está em fase inicial e constituirá uma alternativa para estudos de genômica comparativa e a identificação de antígenos candidatos a novas vacinas.

Neste contexto, certas proteínas altamente conservadas entre procariotos têm sido descritas na literatura como antígenos imunodominantes em infecções bacterianas: as proteínas do choque térmico (Hsps; *Heat Shock Proteins*) (van Eden *et al.*, 2005). Por isso, elas têm sido testadas quanto ao seu potencial como antígeno vacinal, sendo que resultados expressivos foram alcançados com a Hsp de uma bactéria do grupo CMN (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*), a de *Mycobacterium leprae* (Silva *et al.*, 2004).

Considerando que as Hsps são proteínas altamente conservadas, inclusive em relação aos seus epitopos e ainda, considerando os resultados promissores obtidos com a Hsp65 de *M. leprae*, a Hsp de *C. pseudotuberculosis* homóloga a Hsp65 de *M. leprae* constitui um candidato potencial a ser utilizado como antígeno vacinal. Assim, a proposta do presente trabalho foi a de isolar, caracterizar o gene *hsp* de *C. pseudotuberculosis* homólogo ao *hsp65* de *M. leprae* e avaliar o seu potencial na construção de vacinas de subunidade protéica e de DNA.

1.2. ESTRUTURA DO MANUSCRITO

O presente trabalho tem início com uma revisão da literatura sobre o gênero *Corynebacterium* e, em detalhes, sobre a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Esta revisão bibliográfica aborda aspectos da microbiologia e da virulência de *C. pseudotuberculosis* e do seu papel no desenvolvimento da doença linfadenite caseosa em pequenos ruminantes. Em seguida, são apresentados os objetivos gerais e específicos do trabalho. Após uma seção detalhada sobre os materiais e métodos, são apresentados os resultados e discussões divididos em três tópicos principais: (i) o isolamento, clonagem e caracterização molecular do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* e do seu operon; (ii) Construção e a avaliação da resposta imunológica gerada pela imunização com a proteína recombinante Hsp60; e (iii) Construção e a avaliação da resposta imunológica gerada pela imunização com a vacina de DNA baseada no gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Finalmente, são apresentadas as considerações finais e as perspectivas do trabalho.

1.3. REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1. Classificação do gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium*, originalmente criado para a classificação e inclusão do bacilo da difteria humana e outras espécies patogênicas para animais, é extremamente heterogêneo. É classificado no grupo dos actinomicetos, do qual também fazem parte os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (Dorella *et al.*, 2006). Embora as espécies destes gêneros, também denominadas como grupo CMN, apresentem grande diversidade, algumas características são comuns ao grupo, como (i) a organização específica da parede celular, composta principalmente de peptidoglicanos, arabinogalactano e ácidos micólicos, e (ii) o alto conteúdo G + C do genoma (47-74%).

O grupo CMN apresenta muitas espécies de interesse médico/veterinário e biotecnológico e, por isso, assumem um papel relevante no cenário econômico. Entre elas destacam-se *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae*, os agentes etiológicos da tuberculose e da hanseníase, respectivamente. Quanto ao gênero *Corynebacterium*, destacam-se *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeium* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, os agentes causadores de difteria, infecções nosocomiais e linfadenite caseosa em caprinos e ovinos, respectivamente (Mattos-Guaraldi *et al.*, 2003; Tauch *et al.*, 2005; Dorella *et al.*, 2006); e *Corynebacterium glutamicum*, altamente utilizada na produção de aminoácidos, como L-aspartato e L-lisina (Koffas e Stephanopoulos, 2005). Diante da importância destes microrganismos, genomas de bactérias pertencentes ao grupo CMN já tiveram a sua seqüência resolvida ou estão em andamento (tabela

1). Os dados obtidos a partir do genoma destas espécies filogeneticamente relacionadas disponibilizam ferramentas úteis para a análise comparativa deste grupo, o que permite elucidar possíveis mecanismos comuns de virulência e patogenicidade.

1.3.2. Estrutura genômica comparativa de *Corynebacterium*

Quatro espécies do gênero *Corynebacterium* já tiveram seu genoma completamente seqüenciado: *C. jeikeium* (Tauch *et al.*, 2005); *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003); *C. diphtheriae* (Cerdeno-Tarraga *et al.*, 2003); e *C. efficiens* (Nishio *et al.*, 2003). Estas espécies possuem genomas circulares, contendo em média 3.000 kilobases e conteúdo médio de GC de 58%, podendo ou não possuir plasmídeos. Ilhas genômicas distribuídas nos genomas de todas as corynebacteria já seqüenciadas foram observadas, o que ressalta o grande número de eventos de transferência horizontal de genes (de la Cruz *et al.*, 2000). O seu conteúdo gênico médio é de 2.600 genes, e aparentemente existe uma tendência à perda de genes em espécies patogênicas.

Análises de compartilhamento de genes após o seqüenciamento de *C. jeikeium* por Tauch *et al.*, em 2005, demonstraram que aproximadamente 52% dos genes deste organismo (1.089) possuem prováveis ortólogos nos três outros organismos seqüenciados, sendo que 17% dos genes (367) são compartilhados por um ou dois dos organismos. Isto parece ser uma característica do gênero, o que sugere uma estrutura genômica conservada.

1.3.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Corynebacterium pseudotuberculosis, um importante patógeno animal, é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC) – também conhecida como mal-do-carço – que acomete populações de pequenos ruminantes espalhadas por todo o mundo, gerando perdas econômicas significativas (Dorella *et al.*, 2006). Essa bactéria foi isolada pela primeira vez de um caso de linfangite em bovino por um veterinário francês, Edmound Nocard, em 1888. Hugo Von Preisz isolou uma bactéria similar de um abscesso renal de ovino, de onde derivou a denominação “Enfermidade de Preisz-Nocard” (Collett *et al.*, 1994). A LC foi descrita pela primeira vez na Austrália em 1934 por Churchward (Collett *et al.*, 1994), recebendo então a classificação atual após a observação de que as alterações patológicas em animais infectados por esta bactéria assemelham-se às de ovinos tuberculosos.

1.3.3.1. Aspectos microbiológicos

Corynebacterium pseudotuberculosis é um patógeno Gram-positivo intracelular facultativo que exibe formas pleomórficas, que variam desde cocóides a bastões filamentosos medindo cerca de 0,5 µm a 0,6 µm por 1 µm a 3 µm em tamanho. Esta bactéria não possui cápsula, não esporula e é imóvel; contudo, possui fímbrias. É anaeróbia facultativa e as condições ótimas de crescimento são a 37°C em pH entre 7.0 e 7.2. Tem um crescimento inicialmente espaçado na superfície do ágar e, em seguida, se organiza em colônias opacas, de crescimento

concêntrico e de coloração creme alaranjado. O crescimento em meio líquido desenvolve-se como depósitos granulares (Dorella *et al.*, 2006).

1.3.3.2. Propriedades Bioquímicas

O peptidoglicano da parede celular é baseado no ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP) e os açúcares arabinose e galactose estão presentes em grandes quantidades. Cadeias curtas de ácido micólico também são encontradas (Jolly, 1965; Puech *et al.*, 2001; Selim, 2001). As reações bioquímicas de isolados de *C. pseudotuberculosis* variam consideravelmente, principalmente em suas habilidades de fermentação. Todas as linhagens produzem ácido, mas não gás, a partir de muitas fontes de carbono, incluindo glicose, frutose, galactose, manose e sacarose (Merchant e Packer, 1967; Buxton e Fraser, 1977; Jones e Collins, 1986; Holt *et al.*, 1994). A reação bioquímica é positiva para fosfolipase D e catalase, negativa para oxidase e é beta-hemolítica. Linhagens isoladas de pequenos ruminantes geralmente não reduzem nitrato.

1.3.3.3. Susceptibilidade antimicrobiana

Os padrões de susceptibilidade de *C. pseudotuberculosis* a agentes antimicrobianos são muito variados, dependendo da fonte onde o isolado foi obtido. Apesar disso, geralmente são susceptíveis a ampicilina, clorafenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina G e sulfametaxazol-trimetropim (Muckle e Gyles, 1982). De acordo com os autores, a concentração inibitória mínima (CIM) para todos os isolados é similar para os vários agentes

antimicrobianos. Contudo, a resistência a antibióticos difere quando a bactéria se encontra em determinadas condições infecciosas. Fernández *et al.* (2001) encontraram altos valores de CIM para vários agentes antimicrobianos em uma análise de corinebactérias isoladas de mastite em ovelhas. Olson *et al.* (2002) relatam que *C. pseudotuberculosis* é altamente resistente a qualquer droga quando há a formação de biofilme.

1.3.3.4. Taxonomia

Inicialmente, a classificação taxonômica de *C. pseudotuberculosis* foi realizada a partir de características morfológicas e bioquímicas (Muckle e Gyles, 1982; Jones e Collins, 1986). A produção de nitrato redutase foi usada por Biberstein *et al.* (1971) para distinguir o biovar *equi* (isolado de cavalos e gado; redução de nitrato positiva) do biovar *ovis* (isolado de carneiro e cabra; redução de nitrato negativa). Posteriormente, outros autores chegaram à mesma conclusão através de análises do DNA cromossômico por endonucleases de restrição (Songer *et al.*, 1988); de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) do 16S-rDNA (Vanechoutte *et al.*, 1995; Sutherland *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1998) e por eletroforese em gel submetido a corrente em campo pulsátil (PFGE; *Pulse Field Gel Electrophoresis*) (Connor *et al.*, 2000). Uma relação próxima entre *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* foi sugerida pelo fato desses organismos serem os únicos entre as corinebactérias a produzirem fosfolipase D (Groman *et al.*, 1984; Buck *et al.*, 1985). Além disso, algumas linhagens de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* podem produzir a toxina da difteria (TD).

Métodos moleculares, incluindo hibridização de ácidos nucléicos e análises de seqüências do gene de rRNA 16S, foram utilizados para determinar o grau de relação entre diferentes espécies e linhagens de corinebactérias (Riegel *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 1997; Khamis *et al.*, 2005). Dois estudos independentes concluíram que *C. pseudotuberculosis* está proximamente relacionada com *C. ulcerans* (Hou *et al.*, 1997, Takahashi *et al.*, 1997). Riegel *et al.* (1995) concluíram ainda que os biovares *equi* e *ovis* de *C. pseudotuberculosis* não devem ser classificados como subespécies, devido a sua grande similaridade genômica.

Recentemente, análises de seqüências do gene da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) mostram-se mais acuradas que aquelas baseadas no rRNA 16S para a identificação de espécies de corinebactérias (Khamis *et al.*, 2004, 2005). Vários estudos sugerem que os dois métodos devem ser complementares em estudos filogenéticos de espécies de *Corynebacterium* e *Mycobacterium* (Mollet *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Khamis *et al.*, 2004, 2005). Dorella *et al.* (2006), ao construir uma árvore filogenética baseada na seqüência do gene *rpoB*, também demonstraram a clara relação filogenética existente entre *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*.

1.3.3.5. Aspectos gerais da infecção por *C. pseudotuberculosis*

C. pseudotuberculosis é um patógeno que pode ser isolado a partir de infecções em diferentes espécies, incluindo eqüinos e bovinos (causando a acne contagiosa e a linfangite ulcerativa), pombos, camelos, suínos, búfalos e humanos (Peel *et al.*, 1997; Selim, 2001; Williamson, 2001; Yeruham *et al.*, 2004).

1.3.3.5.1. Transmissão

A transmissão e disseminação de *C. pseudotuberculosis* estão relacionadas com a sua resistência às condições ambientais encontradas na criação dos animais (Augustine e Renshaw, 1986; Yeruham *et al.*, 2004). Esta bactéria é resistente em temperaturas baixas e locais úmidos, podendo sobreviver por até oito meses no solo, por quatro meses em galpões de tosquia e por dois meses em feno e materiais contaminados (Radostits *et al.*, 2002).

A transmissão ocorre por contato direto com secreções ou por materiais contaminados. A entrada da bactéria no organismo é facilitada por feridas na pele; contudo, pode penetrar até mesmo pela pele intacta (Williamson, 2001). Os fatores de risco incluem a falta de higiene das instalações, o contato direto entre animais infectados, a poeira e a tosquia. No caso da caprino e ovinocultura brasileira, um importante fator de risco é a vegetação presente no nordeste brasileiro (Alves *et al.*, 1997), caracterizada pela presença de espinhos que podem provocar lesões na pele dos animais. Em bovinos e bufalinos, há evidências de transmissão da bactéria por mosca doméstica e por outros Dípteros (Yeruham *et al.*, 1996; Selim, 2001; Yeruham *et al.*, 2004).

1.3.3.5.2. Casos em Humanos

A infecção humana causada por *C. pseudotuberculosis* demonstra o potencial zoonótico desta bactéria. Este é um evento raro e a maioria dos casos reportados está relacionada ao contato direto com animais doentes ou por exposição a produtos animais contaminados. Aproximadamente 25 casos de

infecção em humanos com esse microrganismo já foram reportados (Mills *et al.*, 1997; Peel *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2005), sendo que a sintomatologia envolve a presença de linfadenite, abscessos e outros sintomas característicos (Peel *et al.*, 1997). Em 1988, foi reportado um caso de infecção humana que envolveu a ingestão de carne caprina crua e leite bovino (Peel *et al.*, 1997). Liu *et al.* (2005) reportaram uma infecção por *C. pseudotuberculosis* durante um implante ocular em um paciente.

1.3.4. Linfadenite Caseosa

A linfadenite caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa crônica e recorrente de relevância econômica. A infecção é associada com a redução do peso de lã, carne e leite, menor eficiência reprodutiva dos animais infectados e condenação de carcaças e couro em abatedouros (Paton *et al.*, 1994; Arsenault *et al.*, 2003).

A doença é manifestada pela presença de necrose nas glândulas linfáticas. Os abscessos se desenvolvem em nódulos linfáticos superficiais e em tecidos subcutâneos – a LC externa – e/ou em órgãos internos, tais como pulmões, rins, fígado e baço, caracterizando a LC visceral (Merchant e Packer, 1967; Piontkowski e Shivers, 1998). Além disso, a infecção pode ser assintomática, o que dificulta as análises epidemiológicas sobre a prevalência dessa doença (Buxton e Fraser, 1977; Paton *et al.*, 1994; Arsenault *et al.*, 2003).

1.3.4.1. Epidemiologia da LC

A incidência da LC é relatada em diversos países, como Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Estados Unidos, Canadá e Brasil (Al-Rawashdeh & al-Qudah, 2000; Connor *et al.*, 2000; Ben Said *et al.*, 2002; Binns *et al.*, 2002; Arsenault *et al.*, 2003; Paton *et al.*, 2003). Na Austrália, a média de prevalência da LC em carneiros é de 26% (Paton *et al.*, 2003); na Inglaterra, 45% dos criadores entrevistados disseram ter observado abscessos em seus rebanhos (Binns *et al.*, 2002). No Canadá, 21% de 485 carneiros examinados em abatedouros apresentaram LC (Arsenault *et al.*, 2003).

No Brasil, estima-se que a maioria dos rebanhos esteja infectada e que a prevalência clínica possa atingir 30% dos animais. Os estados da região Nordeste são os mais afetados, em razão de possuírem a maior concentração de rebanhos caprinos do país (Ribeiro *et al.*, 2001). No Ceará, Pinheiro *et al.* (2000) relataram 66,9% de sinais clínicos de LC. No Rio de Janeiro, a incidência varia entre 3,6 a 100% (Langenegger & Langenegger, 1991). Em Minas Gerais, estado que ainda possui um rebanho reduzido, porém que apresenta crescimento na atividade de caprinocultura, a LC já tem sido observada com alta frequência, principalmente nos rebanhos da região Norte do Estado (Faria *et al.*, 2004), onde 84,3% dos produtores relataram ter problemas com a patologia.

A prevalência da doença apresenta variações quando se analisa o fator hospedeiro. É maior em ovinos se comparada a caprinos; contudo, nas duas espécies, a patologia é mais observada em animais adultos, o que reflete maior exposição aos fatores de risco. Em ovinos, a raça Merino e seus mestiços são as mais propensas, o que pode ser explicado pela presença de uma pele mais fina

apresentando dobras. Estas características propiciam maiores lesões por ocasião da tosquia (Radostits *et al.*, 2002).

1.3.4.2. Determinantes da virulência de *C. pseudotuberculosis*

Há pouco conhecimento sobre os mecanismos moleculares e as bases genéticas da virulência em *C. pseudotuberculosis*. Recentemente, foi demonstrado que quatro genes presentes em um operon, *fag* A, B, C e D têm papel na virulência de *C. pseudotuberculosis* (Billington *et al.*, 2002). Apesar da realização de estudos como este, apenas dois determinantes da virulência de *C. pseudotuberculosis* são bem caracterizados: a exotoxina da fosfolipase D e os lipídeos tóxicos da parede celular.

1.3.4.2.1. Fosfolipase D

Fosfolipase D (PLD) é uma potente exotoxina produzida por *C. pseudotuberculosis* e é considerada como o principal fator de virulência desta bactéria (Lipsky *et al.*, 1982; Hodgson *et al.*, 1999). É um fator de permeabilidade que promove a hidrólise de ligações éster na esfingomielina da membrana de células de mamíferos (Carne e Onon, 1978; Coyle e Lipsky, 1990; McNamara *et al.*, 1995). Esta exotoxina contribui para a dispersão da bactéria do sítio inicial de infecção para sítios secundários dentro do hospedeiro já que o uso de uma antitoxina previne a disseminação de *C. pseudotuberculosis* (Williamson, 2001). Além disso, a vacinação de cabras com exotoxina inativada também é capaz de prevenir a disseminação da bactéria após desafio experimental (Brown *et al.*, 1986). O papel da PLD na virulência da bactéria ficou evidente após a geração de

mutantes *pld*. Estes são incapazes de se disseminar e, além disso, induzem uma resposta imunológica, embora não totalmente satisfatória, contra *C. pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1992).

A disseminação da bactéria por ação da PLD pode ser explicada pela ação dermonecrótica que a mesma exerce danificando as células endoteliais. Isto promove o extravasamento de plasma dos pequenos vasos sanguíneos da derme e, então, o acesso aos vasos linfáticos (Egen *et al.*, 1989; Songer, 1997). Além disso, essa exotoxina é considerada leucotóxica, o que contribui para as lesões e a destruição de macrófagos de caprinos durante infecção com *C. pseudotuberculosis* (Tashjian & Campbell, 1983).

1.3.4.2.2. Lipídeos tóxicos da parede celular

Os lipídeos de superfície de *C. pseudotuberculosis* foram descritos há muito tempo como importantes fatores para a patogênese da doença (Hard, 1972). Segundo Jolly (1966), linhagens mais virulentas possuem mais lipídeos que as linhagens atenuadas.

Esta camada lipídica representa uma proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes em fagolisossomos, além de permitir a aderência dos microrganismos e promover uma citotoxicidade local (Alves *et al.*, 1997). A toxicidade do material lipídico extraído foi demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias (Jolly, 1966) e, segundo Muckle e Gyles (1982), há uma relação direta entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de abscessos crônicos.

1.3.4.2.3. Patogenia e imunologia da LC

A patogenia e a imunologia da LC estão inter-relacionadas. Ao penetrar no hospedeiro, *C. pseudotuberculosis* é capturado localmente por células fagocíticas, os neutrófilos e macrófagos. Após a fagocitose, o fagossomo se funde ao lisossomo; contudo, a bactéria continua a se multiplicar dentro dos fagolisossomos, levando à degeneração e morte celular dos macrófagos. A incapacidade por parte dos macrófagos de eliminar a bactéria pode ser devida, além da presença da camada lipídica, à incapacidade destes de produzir óxido nítrico. O óxido nítrico é um potente efetor na eliminação de patógenos intracelulares e segundo Bogdan *et al.* (1997), a ausência de óxido nítrico em macrófagos pulmonares de ovinos se deve a componentes antigênicos de *C. pseudotuberculosis*.

Com a morte das células do sistema imunológico, há a liberação da bactéria e a formação de uma lesão necrótica (Jones *et al.*, 2000). Assim, as bactérias são liberadas para iniciar um novo ciclo, atingindo diversos órgãos e células. A disseminação envolve a ação de outro determinante de virulência, a exotoxina fosfolipase D (Airello *et al.*, 2001).

Na tentativa de conter e eliminar o microorganismo, ocorre a formação de granulomas (Jones *et al.*, 2000). Microscopicamente, a lesão se inicia pelo aparecimento de células epitelióides que, em seguida, são substituídas por necrose caseosa; esta é a característica predominante desta patologia (Jones *et al.*, 2000). A massa caseosa vai sendo circundada por células epiteliais e linfócitos e, em seguida, por uma camada de tecido conjuntivo fibroso. À medida que a lesão progride, estas camadas celulares e fibróticas vão sofrendo necrose; a

porção epitelial é afetada antes. Enquanto a camada fibrosa ainda é visível, o processo se repete sucessivamente sobre ela. O processo crônico e recidivante resulta no aspecto macroscópico desta patologia: o aspecto de massa esférica laminada, como as camadas de uma cebola (Jones *et al.*,2000).

A formação de granulomas é um processo dependente da imunidade adaptativa. A imunidade adaptativa contra *C pseudotuberculosis* é complexa e envolve tanto uma resposta humoral como mediada por linfócitos T (Paule, 2003). Por isso, estudos sobre a imunidade contra a bactéria são realizados com o intuito de dissecar e estabelecer a importância de cada componente em uma resposta imunológica protetora.

Em estudos sobre a formação de granulomas, Pépin *et al.* (1994) observaram uma diferença na proporção das subpopulações de linfócitos T. De acordo com os autores, há mais linfócitos T CD8 em granulomas no sítio de inoculação em comparação com aqueles presentes em linfonodos drenantes. Esta subpopulação está relacionada com a atividade efetora e citotóxica, ou pode ainda atuar como supressora. Além disso, com o amadurecimento da lesão se observa um aumento destas células em relação a outras subpopulações de linfócitos, como os CD4.

Estudos sobre o perfil de citocinas expressas durante a infecção experimental permitem a correlação com as observações da proporção da subpopulação de linfócitos presentes no granuloma (Pépin *et al.* 1994). De acordo com Pépin *et al.* (1997), diversas citocinas são expressas durante a infecção, entre as quais destaca-se a produção de IL-2 e IL-4 em linfonodos drenantes e de

TNF- α e INF- γ no sítio de inoculação. O INF- γ é de grande importância, pois é necessário para ativar macrófagos, os quais são os responsáveis pela eliminação de patógenos intracelulares. De acordo com Jolly (1965) a resolução da infecção por *C. pseudotuberculosis* está relacionada com a presença de macrófagos ativados dentro da lesão. O papel do INF- γ durante a infecção também foi ressaltado em ovinos desafiados experimentalmente (Hodgson *et al.*, 1992) e em caprinos infectados naturalmente (Regis, 2001).

Além da necessidade de uma resposta citotóxica, o papel da resposta humoral na proteção contra *C. pseudotuberculosis* também foi demonstrada em ensaios de imunização passiva. Camundongos que receberam soro hiperimune de coelhos e de ovinos foram protegidos (Paule, 2003). Segundo os autores, soros antitoxina e anti-bactéria protegem camundongos desafiados com a bactéria. Contudo, os resultados são contrastantes. Irwin e Knight (1975) relataram que a proteção contra *C. pseudotuberculosis* é dependente de linfócitos T e está associada com a diminuição da resposta humoral. Estes resultados ressaltam a importância da imunidade mediada por linfócitos T.

1.3.4.2.4. Tratamento

O tratamento consiste no uso da antibioticoterapia (Stanford *et al.*, 1998). Contudo, esta não é considerada uma estratégia viável, pois possui um custo elevado com um outro agravante: mesmo sendo uma bactéria sensível aos mais variados tipos de antibióticos, a terapia em questão se torna ineficiente em situações de infecção como biofilme (Olson *et al.*, 2002) e em abscessos encapsulados (Radostits *et al.*, 2002).

Outra opção é a drenagem e extirpação dos linfonodos superficiais acometidos. Contudo, essas alternativas possuem falhas relevantes. A drenagem não elimina 100% das bactérias, e assim como a extirpação, não é viável quando linfonodos e órgãos internos estão acometidos (Alves *et al.*, 1997). Além disso, estes tratamentos podem permitir a contaminação ambiental com o patógeno. A quantidade de bactéria liberada por um único abscesso é capaz de infectar todo o rebanho. Portanto, o controle e a prevenção são estratégias mais viáveis.

1.3.4.2.5. Controle

A primeira medida de controle se baseia em procedimentos de manejo cujo objetivo é evitar a disseminação bacteriana. Todos os instrumentos de uso comunitário devem ser mergulhados em um desinfetante potente após contato com cada animal. Galpões, troncos de tosquia e baias de contenção devem ser bem higienizados e desinfetados (Alves *et al.*, 1997).

Os animais também devem ser alvos de cuidados. A tosquia deve ser iniciada pelos animais mais jovens, evitando contato entre os animais. Os que possuem lesões palpáveis devem ser os últimos a serem manipulados. As feridas na pele dos animais devem ser desinfetadas. Agentes bactericidas devem ser adicionados à água a ser utilizada no banho dos animais. No caso de caprinos confinados, evitar equipamentos que constituam possíveis fontes de traumas, como arames. Além disso, deve-se adquirir animais com o histórico livre da patologia e realizar a quarentena dos mesmos (Airello *et al.*, 2001).

Outras medidas mais drásticas são também sugeridas, como o descarte de animais que apresentem lesões aparentes ou que sejam soropositivos em testes

diagnósticos. Contudo, tais testes podem resultar na geração de falso-positivos e, portanto, no descarte de animais não infectados (Menzies *et al.*, 2004). Para regiões endêmicas, se sugere o sacrifício de todos os animais, tanto soropositivos como soronegativos (Radostits *et al.*, 2002). Diante de medidas ineficazes e radicais, o controle deve se basear em estratégias que impeçam a entrada do microorganismo no plantel e que evitem a sua disseminação. Desta forma, aliado ao manejo correto, deve-se adotar medidas preventivas eficazes, como a imunoprofilaxia.

1.3.4.2.6. Vacinas

Considerando o fato de o tratamento da LC ser de alto custo e ineficaz, a medida de melhor custo-benefício contra a introdução da LC no plantel é a imunização. Entretanto, não existe uma vacina eficiente e protetora contra a *C. pseudotuberculosis*. Vários relatos na literatura mostram diferentes estratégias que vêm sendo testadas, como o uso de bactérias atenuadas, mortas, frações contendo antígenos da parede bacteriana, do sobrenadante de cultura bacteriana e uma mistura de componentes celulares e sobrenadante (Holstad, 1989; LeaMaster *et al.*, 1987; Brogden *et al.*, 1990; Eggleton *et al.*, 1991; Ellis *et al.*, 1991). Todas as preparações ofereceram certo grau de proteção contra infecções experimentais e até mesmo naturais; contudo, os níveis de proteção e a severidade das lesões são variáveis.

1.3.4.2.6.1. Vacinas comerciais

A maioria das vacinas licenciadas para fins comerciais é conjugada a outros patógenos, tais como *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi* e *Clostridium chavoei*. No entanto, a eficácia contra a *C. pseudotuberculosis* não foi alcançada. Nestas vacinas, a exotoxina fosfolipase D se encontra inativada (Piontkowski e Shivvers, 1998; Stanford *et al.*, 1998; Williamson, 2001). No Brasil, uma vacina viva atenuada de *C. pseudotuberculosis*, a linhagem 1002, foi licenciada desde 2000 e vem sendo industrializada, em versão liofilizada, pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (<http://www.ebda.ba.gov.br>). Entretanto, esta vacina não vem apresentando o mesmo sucesso em testes de campo, sendo bastante variável o nível de proteção obtida.

As vacinas utilizadas apresentam aspectos negativos que devem ser considerados quanto à possibilidade de sua utilização. Como exemplo, nem todas as vacinas licenciadas para ovinos têm a mesma eficiência para caprinos. Por não se adequarem a todos os casos, normalmente é necessário ajustar o programa de vacinação a cada caso (Williamson, 2001). A ineficácia do processo de imunização pode ainda ser associada ao uso incorreto das vacinas pelos criadores. Além disso, o estudo da disseminação da bactéria pelo plantel demonstrou que animais aparentemente sem abscessos supurados também são transmissores (Paton *et al.*, 2003).

Os resultados até então obtidos demonstram a necessidade de desenvolver uma vacina que ofereça proteção eficiente, com a diminuição acentuada dos efeitos colaterais. Além disso, vacinas mais eficientes contra *C.*

pseudotuberculosis seriam aquelas que fornecessem uma proteção esterilizante ao invés de uma neutralizante.

1.3.4.2.6.2. Vacinas de sub-unidade protéica e vacinas de DNA

Com o intuito de obter uma vacina protetora e mais segura, diferentes estratégias vêm sendo testadas como vacinas recombinantes e vacinas de DNA em caprinos e ovinos. Para isso, tem-se utilizado como antígeno vacinal a PLD, já que é um dos poucos fatores de virulência conhecidos e é a proteína mais bem caracterizada de *C. pseudotuberculosis*.

A exotoxina PLD já foi purificada, clonada e expressa em *Escherichia coli* (Egen *et al.*, 1989; Hodgson *et al.*, 1990; Songer *et al.*, 1990; McNamara *et al.*, 1995) e tem sido alvo de intensos estudos. O contínuo desenvolvimento de pesquisas com essa toxina deve-se aos resultados significativos de testes vacinais realizados em ovinos e caprinos (Holstad *et al.*, 1989, Eggleton *et al.*, 1991). Contudo, a imunização com o toxóide induz uma proteção parcial e ainda se observam lesões de graus variados.

A proteção contra *C. pseudotuberculosis* é dependente, principalmente, de uma resposta imunológica que envolva a produção de INF- γ e de células T citotóxicas. Somente a resposta humoral não é suficiente para obter proteção. O processo de gerar uma resposta humoral e/ou mediada por células é dependente, além de outros fatores, do processamento e apresentação do antígeno ao sistema imunológico (Lima *et al.*, 2001).

Como regra geral, os fragmentos de antígenos exógenos, como bactérias atenuadas e proteínas recombinantes, são capturados por fagocitose, pinocitose

ou endocitose e, então, processados e apresentados preferencialmente via MHC II. Este será reconhecido por uma subpopulação de linfócitos T, os CD4+. A atividade da CD4+ é essencial para a geração de uma resposta imunológica protetora. Apesar de desempenhar diversas funções quanto ao desenvolvimento de uma resposta imunológica, como indutoras (reconhecimento do antígeno e ativação das células T) e efectoras (produção de citocinas e atividade citotóxica), sua principal função é a de prover atividade auxiliadora. Por isto, estas células são também denominadas células T auxiliadoras (Shams, 2005).

Após serem estimuladas com o antígeno, estas células expressam diferentes citocinas. De acordo com o perfil produzido, estas células podem ser diferenciadas em 2 subclasses: Th1 ou Th2. As Th1 produzem INF- γ e IL-2; ativam fagócitos profissionais e células T citotóxicas (Tc). As Th2 produzem IL-4 e agem primariamente nas células B. Auxiliam na expansão clonal e na diferenciação de células B. Estas são responsáveis pela produção de anticorpos. Assim, as células CD4+ exibem importante papel no desenvolvimento da resposta humoral. Além disso, as células CD4+ são necessárias para a indução de Tc e por sustentar a resposta por CD8+ (Mowat e Rweyemamu, 1997).

Antígenos processados de forma endógena, ou seja, dentro do citoplasma da célula hospedeira, são fragmentados em peptídeos e ou aminoácidos e estes irão interagir com sítios específicos da molécula do complexo principal de histocompatibilidade de classe tipo I (MHC I). A associação resultante dos peptídeos relacionados com o antígeno e MHC I migram para a superfície celular, onde esse complexo ativará linfócitos T CD8+. Esta subpopulação de linfócitos está diretamente relacionada com a ativação da Tc. Estas células possuem um

papel pivô na identificação e eliminação de células hospedeiras infectadas por patógenos intracelulares (Mowat e Rweyemamu, 1997). Os antígenos expressos a partir da vacina de DNA são reconhecidos por esta via.

Diante de grandes expectativas introduzidas com a vacina de DNA, pesquisas estão sendo realizadas quanto aos seus benefícios potenciais em relação à linfadenite caseosa. Chaplin *et al.* (1999) construíram e testaram uma versão atenuada de PLD apresentada em vacina de DNA na imunização de ovinos. Esta ainda expressava o domínio extracelular de CTLA-4, que se liga com alta afinidade à molécula co-estimulatória B7 das células apresentadoras de antígenos. A função foi a de aumentar a resposta humoral. O resultado foi o de uma proteção parcial contra o desafio experimental de *C. pseudotuberculosis*. O resultado foi similar ao obtido pela vacina de subunidade inativada por formalina contra LC em ovinos (Muckle e Gyles, 1982; Paton *et al.*, 1994; Stanford *et al.*, 1998). Esta é a única vacina de DNA descrita na literatura que foi desenvolvida com a finalidade imunoprolática contra a *C. pseudotuberculosis*.

A mesma vacina de DNA foi testada em relação a sua eficácia quando administrada por diferentes vias. Em ovinos, a vacina foi administrada pelas vias intra-muscular e subcutânea. A via de administração influencia de forma significativa a eficácia da vacina, sendo que a via intra-muscular é a mais eficiente para o modelo proposto (de Rose *et al.*, 2002). Com estes estudos, novas possibilidades de inovação e aperfeiçoamento foram abertas na área de imunoprolaxia veterinária, o que pode ser utilizado contra a linfadenite caseosa.

Apesar da PLD induzir uma proteção significativa como antígeno vacinal, outros fatores devem ser considerados: a sua eficácia variada, a indução de

proteção neutralizante, diminuição do número e do tamanho dos abscessos e ainda, o fato de que alguns animais demonstram sinais clínicos de disseminação bacteriana (Ellis *et al.*, 1991; Paton *et al.*, 2003). Estes fatores demonstram a necessidade de procurar candidatos a antígenos vacinais que permitam a indução de uma imunidade protetora ideal sem estes problemas apresentados.

1.3.4.2.6.3. Candidatos a antígenos vacinais

A busca de antígenos imunodominantes de *C. pseudotuberculosis* vem sendo realizada. Anticorpos com alta especificidade produzidos por células secretoras de anticorpos (CSA), obtidas de infecções induzidas em ovinos, foram usados como sondas para a procura de antígenos de *C. pseudotuberculosis* através da técnica de *Immunoblot*. Um dos primeiros antígenos reconhecidos em *immunoblots* foi uma protease secretada de 40 kilodaltons, a CP40 (Wilson *et al.*, 1995) Testes de ELISA confirmaram os resultados obtidos com o *immunoblot* e ensaios em campo com este antígeno semi-purificado mostraram que CP40 era altamente protetora contra LC induzida experimentalmente (Walker *et al.*, 1994). Embora muitos outros componentes imunogênicos secretados-excretados tenham sido descritos usando a técnica de *immunoblot* (Paule *et al.*, 2003, Paule *et al.*, 2004), essas proteínas ainda não foram caracterizadas, o que dificulta a sua utilização.

Outra alternativa na busca de antígenos imunodominantes é a vacinologia reversa. A partir de seqüências genômicas e de análises *in silico*, prediz-se antígenos potenciais que são então isolados, clonados, expressos, purificados e, finalmente, utilizados na imunização para serem avaliados quanto ao seu potencial

vacinal. Contudo, como o seqüenciamento do genoma de *C. pseudotuberculosis* ainda está em fase inicial, uma alternativa seria a busca de antígenos a partir da genômica comparativa.

Neste contexto, certas proteínas altamente conservadas entre procariotos têm sido descritas na literatura como antígenos imunodominantes em infecções bacterianas, as proteínas do choque térmico (Hsps; *Heat Shock Proteins*) (van Eden *et al.*, 2005). Estas proteínas têm sido testadas quanto ao seu potencial como antígeno vacinal, sendo que resultados expressivos foram alcançados até mesmo com a Hsp de uma bactéria do grupo CMN, a de *M. leprae* (Silva *et al.*, 2004).

1.3.4.2.7. Proteínas do Choque Térmico

1.3.4.2.7.1. História e Características

As proteínas do choque térmico (Hsps) foram assim denominadas após um experimento que demonstrou o aumento nos níveis de expressão gênica destas proteínas em larvas de *Drosophila melanogaster* após exposição ao choque térmico (Pockley (2001). A denominação de proteínas do choque térmico é, contudo, uma terminologia inadequada. A expressão destas não é induzida unicamente sob situações de mudanças de temperatura; outros tipos de estresse celular também estão envolvidos, como o aumento dos níveis de expressão. Entre eles tem-se o estresse oxidativo, deficiências nutricionais, radiação ultravioleta, exposição a agentes químicos, infecção viral e injúria por isquemias (Pockley, 2001).

De acordo com o peso molecular, estas proteínas foram classificadas em seis famílias: Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp100. São proteínas altamente conservadas durante o processo evolutivo; sendo que as mais conservadas são as famílias Hsp60 e Hsp70. As Hsps podem se apresentarem diferentes localizações celulares, tanto em procariotos como em eucariotos (Gullo e Teoh, 2004). Apesar de serem mais referidas como proteínas citosólicas, foram também localizadas na parede celular e como proteínas exportadas (Moseley, 2000).

1.3.4.2.7.2. Caracterização genética

Em procariotos, os genes mais estudados são *hsp60* (*groEL*) e *hsp70* (*dnaK*). Os dois freqüentemente são organizados em operons. Normalmente, o gene *hsp60* é encontrado em um operon bicistrônico. O outro gene componente é o da co-chaperonina *hsp10* (*groES*). O arranjo deste operon se encontra na seqüência “*promotor-hsp10-hsp60*” e recebe a denominação de GroE (Eom *et al.*, 2005). Este operon pode estar em uma única cópia no genoma (Kuchanny-Ardigò & Lipinska, 2003; Laport *et al.*, 2006) ou em múltiplas cópias (Lee *et al.*, 1997). *groEL* pode ainda se encontrar sem o gene *groES* (Rajaram *et al.*, 2001). No gênero *Corynebacterium*, foi relatada a presença de 2 parálogos do gene *hsp60* no genoma. Um deles, a cópia 1 pertence ao operon GroE. O segundo, a cópia 2, está presente em uma unidade de transcrição (Barreiro *et al.*, 2004). Ao contrário da organização gênica do operon de *hsp60*, a do *hsp70* não é bem conservada durante a evolução (Laport *et al.*, 2006).

Em bactérias gram-positivas, os operons dos genes *dnaK* e *groEL*, são regulados negativamente pelo repressor HrcA (Naberhaus, 1999). Este repressor se liga a uma seqüência repetida e invertida, denominada CIRCE, que precede os genes dos operons (Hecker *et al.*, 1996). Em *C. glutamicum*, também foi relatada a presença destes elementos. Contudo, em GroEL2, além dos CIRCE, há as seqüências HAIR na mesma região promotora, o que sugere a dupla regulação gênica por HrcA e HspR (Barreiro *et al.*, 2004).

1.3.4.2.7.3. Funções das Hsps

Proteínas extremamente conservadas sugerem uma função essencial para a sobrevivência celular. As Hsps exercem várias funções celulares; sendo que a principal é a de chaperone molecular. Estas moléculas são responsáveis por estabilizar e permitir que proteínas obtenham a conformação adequada (Gullo & Teoh, 2004). As principais Hsps estudadas quanto a esta função são as das famílias Hsp60 e Hsp70. Estas estão envolvidas no transporte das proteínas entre os compartimentos celulares e na formação de complexos multiméricos, como anticorpos e moléculas de MHC (Zügel e Kaufmann, 1999).

Hsp60 promove a conformação protéica intracelular adequada e o transporte de proteínas. Preferencialmente, se encontra no citoplasma e mitocôndrias. Além de exercer a função de chaperone molecular, a Hsp60 também está envolvida em outros processos. Em alguns microorganismos, há um ou mais parálogos de Hsp60. Apesar de não ser claro o porquê, parece que as duas seqüências diferentes produzem proteínas com diversas funções. Em *Mycobacteria*, o GroEL2 que se encontra em uma unidade de transcrição,

normalmente exerce a função de chaperone molecular. GroEL1 está envolvida na biossíntese de ácido micólico durante a formação de biofilme (Ojha *et al.*, 2005).

Assim como em *Mycobacteria*, Barreiro *et al* (2005) relatam uma situação parecida quanto aos parálogos de Hsp60 em *C. glutamicum*. A análise de proteomas demonstrou que na linhagem analisada quanto à resposta ao aumento de temperatura, ATCC 13032B, GroEL1 estava ausente quando comparada à linhagem selvagem. O gene estava truncado devido a uma seqüência de inserção localizada a 327 pb após o códon de início. O autor conclui que este parálogo é dispensável em estresse de temperatura e que GroEL2 exerce as funções de chaperone molecular.

A Hsp60 normalmente não age sozinha. Ela necessita da ação conjunta de uma co-chaperonina, a Hsp10. Dois anéis formados pela Hsp60 aliados à Hsp10 formam um complexo, o GroE. Este exerce a função de chaperone molecular em um processo dependente de ATP (Radford, 2006) (figura 1). Além da ação de chaperone molecular, o complexo está envolvido com a síntese da parede celular em *E. coli* (McLennan e Masters, 1999).

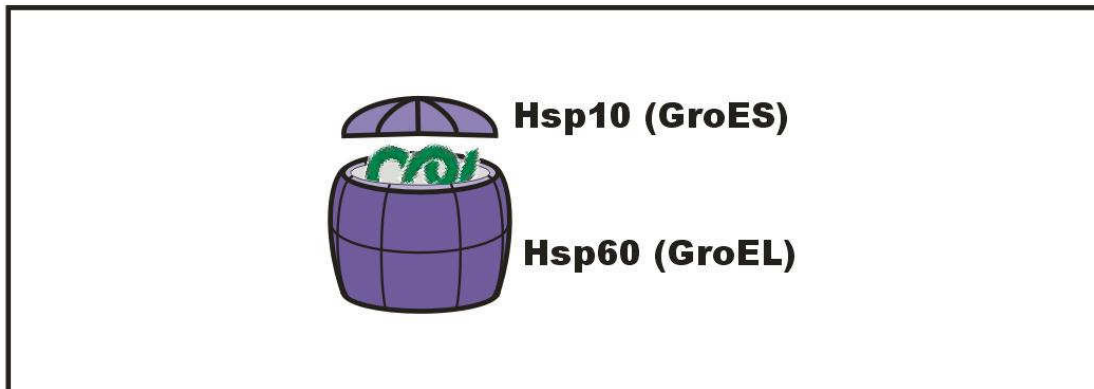


Figura 1: Associação entre chaperonina e co-chaperonina. Para exercer a função de chaperones moleculares, dois anéis formados por subunidades de Hsp60 se unem a um anel composto de subunidades de Hsp10. A proteína submetida a esta ação se localiza na cavidade do anel.

As funções já descritas para as Hsps estão inter-relacionadas com a sua principal função, a de chaperone molecular. Contudo, há outra característica que as tornam únicas e que atrai a atenção de pesquisadores. Elas possuem diversas propriedades imunológicas, o que as tornam singulares se comparadas a outras proteínas conservadas (Prohászka e Füst, 2004).

1.3.4.2.7.4. Hsps como antígenos vacinais

O Hsp60 e o Hsp70 de microorganismos são considerados antígenos imunodominantes. A resposta humoral e a mediada por linfócitos T têm sido detectadas após a infecção por bactérias, protozoários, fungos e helmintos. Em camundongos infectados com *M. tuberculosis*, 10 a 20% de todas as células T são específicas para a Hsp65 (Silva, 1999).

De acordo com van Eden *et al* (2005), há três fatores explicativos para a imunodominância das Hsps. Primeiramente, por serem moléculas muito

conservadas, ao encontrar uma bactéria, a resposta imunológica pode ser dirigida contra epítomos conservados reconhecidos por células de memória previamente dirigidas contra bactérias não relacionadas, como aquelas presentes na microflora intestinal. Segundo, durante situações de estresse, as células do próprio hospedeiro respondem aumentando os níveis de expressão de suas Hsps, as quais também se tornam disponíveis para o reconhecimento pelo sistema imunológico. Terceiro, durante a infecção, as chaperones podem estar associadas aos antígenos liberados durante a ação antimicrobiana, sendo que o complexo antígeno-Hsps é capturado, processado e apresentado ao sistema imunológico, com o intuito de gerar uma resposta eficiente contra o patógeno invasor.

Por serem antígenos imunodominantes e diante dos diversos efeitos estimulantes sobre o sistema imunológico, as Hsps são consideradas antígenos potenciais a serem utilizados na profilaxia contra os mais variados agentes etiológicos de doenças infecciosas. Além disso, segundo Silva (1999), por serem expressas durante estresses celulares como a infecção, as Hsps constituem antígenos promissores de patógenos intracelulares. De acordo com Zügel e Kaufmann (1999), por serem encontradas em diferentes localizações celulares, estas proteínas são alvos acessíveis para a resposta humoral.

As Hsps, como antígenos, tem obtido sucesso em alguns modelos experimentais, mesmo sendo apresentadas de diferentes formas ao sistema imunológico. Sob a forma de subunidade protéica e de vacina de DNA, a imunização com a Hsp60 de *Yersinia enterocolitica* mostrou proteção após o desafio com a linhagem virulenta derivada deste microorganismo. Muitos trabalhos já foram publicados relatando as vantagens de utilizar uma vacina de DNA

baseada no gene *hsp65* de *M. leprae* como antígeno contra a infecção por *M. tuberculosis*. Camundongos imunizados com esta vacina e posteriormente desafiados demonstraram o seu potencial profilático (Bonato *et al.*, 1998); o potencial terapêutico foi observado em animais infectados e posteriormente imunizados (Silva *et al.*, 2005).

Os gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* apresentam muitas semelhanças. Em relação à *C. pseudotuberculosis*, esta bactéria recebeu essa denominação pelos sinais clínicos muito semelhantes aos da tuberculose. Assim como a última, a resolução da linfadenite caseosa é dependente da presença de macrófagos ativados dentro da lesão e de uma resposta imunológica que apresente um perfil de citocinas do tipo Th1.

As semelhanças entre os dois microorganismos se estendem além da patologia. Por serem filogeneticamente próximos, sugere-se um alto grau de conservação entre seus genes. Como anteriormente já mencionado, as Hsps são proteínas naturalmente muito conservadas, até mesmo entre organismos que não sejam tão próximos na filogenia. A sua conservação se reflete nas características bioquímicas e até mesmo na conservação de epítomos. Assim, diante do sucesso obtido com a imunização com a Hsp65 de *M. leprae*, a proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* pode também ser uma excelente alternativa a ser testada como antígeno vacinal no desenvolvimento de uma vacina mais efetiva contra *C. pseudotuberculosis*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Isolamento, clonagem e a caracterização molecular do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* e a avaliação do seu potencial como antígeno vacinal ao ser utilizado no desenvolvimento de vacinas de subunidade protéica e de DNA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento por PCR, clonagem no vetor pTOPO e caracterização molecular, por seqüenciamento e análises *in silico* do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* e do seu operon.
- Construção da vacina de subunidade protéica.
 - Clonagem do gene *hsp60* em vetor de expressão procarioto
 - Expressão em *E. coli* e purificação da proteína recombinante Hsp60
 - Imunização de camundongos com a proteína recombinante e avaliação da resposta imune humoral, celular e da proteção
 - Avaliação da resposta humoral em caprinos infectados com a linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis* Pus 6
- Construção da vacina de DNA
 - Clonagem do gene *hsp60* em vetor de expressão eucarioto
 - Extração e purificação dos vetores a serem utilizados como vacina de DNA
 - Imunização de camundongos com a vacina de DNA e avaliação da resposta imune humoral, celular e da proteção

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens Bacterianas, Plasmídeos e Condições de Cultivo

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho de dissertação estão listados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Os meios de cultivo utilizados foram o Luria-Bertani (LB) para *Escherichia coli* e o “Infusão Cérebro-Coração” (BHI) para *C. pseudotuberculosis*. Estes meios foram suplementados com 1,5% de ágar bacteriológico para cultura em meio sólido. As culturas de *E. coli* e de *C. pseudotuberculosis* foram cultivadas sob agitação a 37°C. Quando necessário, os meios de cultura foram suplementados com ampicilina (100µg/mL) e canamicina (50µg/mL). A concentração destes foi utilizada de acordo com as recomendações dos fabricantes dos vetores (GIBCO BRL e Invitrogen).

Tabela 2: Linhagens bacterianas utilizadas.

Espécie	Linhagem	Fonte
<i>Escherichia coli</i>	Top10 (<i>hsdR</i> ; <i>mcrA</i> ; <i>lacZ</i> ΔM15; <i>endA1</i> ; <i>recA1</i>)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	B178 (W3110 <i>galE sup</i> ⁺)	Kuchanny-Ardigo e Lipinska (2003)
<i>Escherichia coli</i>	CG2241 (B178 <i>groEL44 Tc</i> ^R)	Kuchanny-Ardigo e Lipinska (2003)
<i>C.pseudotuberculosis</i>	T1 ^a	UFBA
<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>Pus 6</i> ^b	LGCM

^a: linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* pertencente à coleção de microorganismos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil

^b: linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* isolada de campo pertencente à coleção de microorganismos do Laboratório de Genética celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais

Tabela 3: Plasmídeos utilizados

Plasmídeos	Características relevantes	Fonte
pTOPO	ColE1/Ap ^r	Invitrogen
pProEx-Hta	PBR322, Ap ^r ; vetor de expressão contendo uma cauda de 6 histidinas, sob o controle do promotor híbrido do triptofano e da lactose (<i>trc</i>) e do gene repressor <i>lacI</i> ^A	GIBCO BRL
pVAX1	pUC/Km ^r ; vetor de expressão eucarioto contendo sinal de poliadenilação derivado da seqüência codificadora do hormônio de crescimento bovino (BGH), sob o controle do promotor do citomegalovírus humano (CMV)	Invitrogen
pTOPO: <i>hsp60</i>	Vetor pTOPO:blunt contendo a seqüência codificadora do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	LGCM
pTOPO: <i>hsp60e</i>	Vetor pTOPO:blunt contendo a seqüência codificadora do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> com os sítios de restrição e a seqüência de Kozak a ser clonada no vetor eucarioto	LGCM
pTOPO: <i>hsp60p</i>	Vetor pTOPO:blunt contendo a seqüência codificadora do gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i> com os sítios de restrição a ser clonada no vetor procarioto	LGCM
pProEx-Hta: <i>hsp60</i>	Vetor de expressão procarioto contendo o inserto referente ao gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	LGCM
pVAX1: <i>hsp60</i>	Vetor de expressão eucarioto contendo o inserto referente ao gene <i>hsp60</i> de <i>C. pseudotuberculosis</i>	LGCM

3.2. Manipulação do DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação do DNA plasmidiano e/ou cromossômico, foram realizadas de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook *et al.*, 1989), com algumas modificações. Todos os plasmídeos utilizados neste trabalho de dissertação, com exceção do pTOPO, foram transformados em *E. coli* Top10 por eletrotransformação, sendo que a cultura destes clones foi estocada em glicerol 80% a -70°C . Quando necessário, foram isolados através do método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando o “Kit” comercial Wizard™ Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega). A qualidade do material obtido após a manipulação do DNA, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada após leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, e também através da resolução eletroforética em gel de agarose a 1%. As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações do fabricante (Invitrogen).

3.3. Extração de DNA cromossômico

A extração de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* foi realizada a partir de culturas de 20 mL em meio BHI, as quais foram cultivadas durante 72 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, elas foram centrifugadas a 5.000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de solução I (Tris-HCl 10mM, pH 7.0; EDTA 10mM pH 8.0; NaCl 300mM; RNase A 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após homogeneizá-la, a mistura foi novamente

centrifugada, desta vez a 13.000 rpm, por 10 minutos a temperatura ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de solução II (Tris-HCl 10mM; EDTA 10mM; NaCl 300mM; Lisozima 10mg/mL), que foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi acrescentado à mistura 30 µl de sarcosil 30%; a amostra foi homogeneizada por 15 minutos e então deixada em banho-maria a 65°C por 5 minutos, seguido por incubação a 4°C por 5 minutos.

Para a purificação do DNA extraído, foi utilizado um protocolo padrão de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Sambrook et al, 1989). Em resumo, 1mL desta solução foi adicionado à amostra. Após a homogeneização da mesma, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 7 minutos. A fase superior da amostra foi retirada e transferida para um novo microtubo de 2 mL. Repetiu-se o passo de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Ao final, a fase superior da amostra foi transferida para um novo microtubo, a fim de proceder-se à precipitação do DNA genômico. Foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto (Synth), 200mM de NaOAc e 20µg/µl de uma solução de glicogênio. Após esta etapa, a mistura foi incubada por 18 horas à -20°C e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. Acrescentou-se ao DNA precipitado, de etanol 70% seguindo-se de centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o DNA seco à temperatura ambiente. O mesmo foi ressuspenso em 50 µl de água miliQ estéril e tratado à 37°C, em Banho Maria durante 1 hora com Rnase A (100µg/mL).

3.3.1. Resolução eletroforética

Os DNA genômico acrescidos de 1:10 do volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 25%) foram fracionados em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris base 89 mM pH 7.2, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM pH 8.3), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As corridas foram realizadas a 100 Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado e o gel fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta (320 nm) através do sistema de documentação fotográfica “Kodak Digital Science™ DC40 Camera” (Kodak) e a foto processada pelo programa “Eletrophoresis Documentation and Analysis System” (Kodak). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder e 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.4. Isolamento e caracterização molecular do gene *hsp60*

3.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase foi a técnica utilizada para o isolamento do gene *hsp60*. Os iniciadores utilizados na amplificação com este propósito foram sintetizados de acordo com as extremidades 5´ e 3´ da seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. diphtheriae* (NC_002935). As seqüências dos iniciadores e a temperatura de anelamento se encontram na tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros utilizados na PCR referentes à amplificação do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*.

Iniciador senso	5'- GATGGCAAAGCTGATTGCA-3'
Iniciador anti-senso	5'-TTAGTGGTGGTGATGGTG-3'
Temperatura de anelamento	50°C

As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 50 µL e continham: 20 ng de DNA genômico, 2 pmoles de cada iniciador, tampão de PCR 1X II (20mM Tris-HCL pH 8,4; 50mM KCl; 1,5mM de MgCl₂; 200µM dNTPs) e 1U de AccuPrime™ Taq DNA polimerase. A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), cujo programa foi: primeira desnaturação à 95°C durante 5 minutos, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto; anelamento durante 40 segundos; extensão a 68°C durante 2 minutos e 30 seg e extensão final por 7 minutos a 68°C.

Em seguida, 1/10 do volume de cada amostra foi analisado em gel de agarose 1% e documentado como descrito no item 3.3.1.

3.4.2. Purificação do fragmento de DNA

O fragmento de DNA correspondente ao gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foi recuperado do gel de agarose e purificado de acordo com o protocolo do

fabricante do “Kit” comercial “Concert TM Rapid Gel Extraction System” (Gibco BRL).

3.4.3. Clonagem no vetor pTOPO

O fragmento de DNA amplificado referente ao gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foi clonado no vetor TOPO:Blunt, procedimento realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen).

3.4.4. Transformação bacteriana

3.4.4.1. Confeção de *E. coli* eletrocompetentes

Uma colônia de *E. coli* TOP10 foi inoculada em 5mL de meio LB e incubada durante 18 horas à 37°C sob agitação de 150 rpm. Um a alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 300 mL de LB e incubada a 37°C sob agitação até atingir absorbância (OD_{600nm}) entre 0.2 e 0.3. Uma vez alcançado o crescimento desejado, a cultura foi centrifugada a 6.000 rpm durante 18 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 300 mL de uma solução de glicerol 10% estéril, processo que foi repetido novamente por 4 vezes. Após a última lavagem, as bactérias foram ressuspendidas em 1mL de solução glicerol 10%. Esse 1 mL foi dividido em alíquotas de 100 µL que foram estocadas a -70°C.

3.4.4.2. Transformação da *E. coli* TOP10

Os produtos de ligação (inserto e vetor pTOPO) foram dialisados em filtros de nitrocelulose para eliminar os sais minerais e 10 µL foram utilizados para

transformar 100 μL de *E. coli* Top10. As eletrotransformações foram realizadas utilizando 2500V com um eletroporador CelljtecUno (Thermo Electro Corporation, EUA). Após este tratamento, foi adicionado 1 mL de meio LB, sem antibiótico, para cada alíquota de células transformadas. Após a eletroporação, o meio, juntamente com as bactérias eletrocompetentes e o DNA utilizado na eletroporação, foram ressuspendidos e, então, incubados por 1 hora a 37° C. Diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e X-GAL (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas à 37°C durante 18 horas.

3.4.5. Verificação da presença e tamanho do inserto

3.4.5.1. Extração do DNA plasmidiano em pequena escala (Minipreparações)

Para a extração de plasmídeos, clones brancos obtidos após a transformação foram cultivados em 5 mL de meio LB suplementados com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a 37°C por 18 horas sob agitação. Após este período, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 7 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspendido em 200 μl da solução I (Tris 25mM pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0; glicose 50mM). Foram então adicionados 400 μl de solução II (0.2M de NaOH; SDS 1%), mistura que foi invertida gentilmente por aproximadamente 5 minutos. 100 μl de clorofórmio e 300 μl de solução III (AcK 5M; ácido acético glacial) foram adicionados e a mistura resultante foi homogeneizada e então centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e, então, acrescentou-se 2,5 volumes de etanol absoluto e 500 mM de acetato de potássio

(pH 4.0), e após esta etapa, a mistura foi incubada durante 2 horas a -20°C . Depois deste período, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Foram acrescentados ao DNA precipitado, 1mL de etanol 70%, seguindo-se de centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi ressuspenso em 20 μl de água mili-Q. O mesmo foi tratado com RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em banho-maria a 37°C .

3.4.5.2. Confirmação da presença e tamanho do inserto no vetor

Para verificar a presença do inserto e peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor pTOPO, o inserto do DNA plasmidiano foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os mesmos iniciadores do item 3.4.1. As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 10 μl , contendo 20pM de cada iniciador, 0,25mM de dNTPs, 0,1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2mM de MgCl_2 e tampão da enzima 1X concentrado (Invitrogen). A reação ocorreu em um aparelho termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). O programa utilizado foi o mesmo do item 4.4.1.

Após a reação, todo o volume da mesma foi aplicado em gel de agarose à 1%, sendo a corrida eletroforética analisada e documentada como descrito no item 3.3.1.

3.4.6. Caracterização do gene *hsp60*

3.4.6.1. Reações de Seqüenciamento

Os iniciadores utilizados no seqüenciamento foram: M13 senso 5´GTT TTC CCA GTC ACG AC 3´ e M13 anti-senso 5´CAG GAA ACA GCT ATG AC 3´, quando as amostras a serem seqüenciadas se encontravam clonadas no vetor TOPO. Ainda, para o seqüenciamento do gene *hsp60*, foi utilizado um par de iniciadores: o iniciador senso (5´GGA CGG TGT GGT AAC GGT TGA AG 3´) e o antisenso (5´CCA TCC ACG ATG ATG GTC TCG AC 3´). Estes são complementares a uma seqüência interna do gene. Quando as amostras a serem seqüenciadas estavam clonadas em outros vetores ou eram produtos purificados de PCR, foram seqüenciados utilizando os iniciadores específicos do inserto em questão, os mesmos utilizados nos procedimentos de clonagem.

3.4.6.2. Busca de homologia em bancos de dados e análises *in silico*

As seqüências editadas foram comparadas com outras seqüências de DNA e proteínas relacionadas e previamente depositadas em banco de dados, pelo algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no sítio do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para a comparação entre seqüências de ácidos nucléicos utilizou-se o programa BLASTn e para a comparação entre proteínas, o BLASTx. O alinhamento de aminoácidos foi feito utilizando o programa CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

A predição de diversos caracteres presentes na Hsp60 foi realizada através de ferramentas de análises de seqüências disponíveis no portal EXPASY (<http://www.expasy.ch/>). A procura por domínios conservados foi realizada através

de procura no banco de dados do PROSITE (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/prosite/>) e por uma busca no banco de dados disponível no sítio do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov/Structure/cdd/>). A predição do peso molecular e do ponto isoelétrico de cada seqüência de aminoácidos foi feita utilizando o Compute pI/Mw (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). A estrutura secundária foi predita através do programa PSIPRED PREDICTION (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) de acordo com Mc Guffin *et al.* (2000). A modelagem da proteína foi realizada com o auxílio do programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>).

3.5. Caracterização molecular do gene a jusante do gene *hsp60*

3.5.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O gene *hsp60* em actinomicetos está presente em 2 cópias. A cópia 1 se encontra organizada em um operon. Este é constituído por 2 genes que encontram-se em uma seqüência conservada: *promotor-hsp10-hsp60*. A reação em cadeia da polimerase foi a técnica utilizada para o isolamento de uma possível “ORF” localizada à extremidade 5’ do gene *hsp60* de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Com este propósito, um par de iniciadores foi desenhado: o iniciador *hsp10* 5’, a partir da seqüência do gene *hsp10* de *C. diphtheriae* (NC_002935), e o iniciador *hsp60* 3’, a partir da seqüência interna do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. As seqüências dos iniciadores e a temperatura de anelamento se encontram na tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros utilizados na PCR referentes à amplificação do gene *hsp10* de *C. pseudotuberculosis*.

Iniciador senso (<i>hsp10 5'</i>)	5' GTG GCT AAC GTC AAT ATC AAG CC 3'
Iniciador anti-senso (<i>hsp10 3'</i>)	5' CTT CAG GAT GCC TTC ACG GG 3'
Temperatura de anelamento	50°C

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL contendo 20ng de DNA genômico, 2 pmoles de cada primer, tampão de PCR 1X, 0,25mM dNTPs 1.5mM de MgCl₂ e 2.5U de Taq DNA Polymerase Recombinante (Invitrogen). A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando as seguintes condições: primeira desnaturação à 94°C durante 3 minutos, seguida por 29 ciclos de de snaturação a 95°C durante 1 minuto; anelamento durante 40 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto e extensão final por 5 minutos a 72°C.

Em seguida, 1/10 do volume de cada amostra foi analisado em gel de agarose 1% e documentado como descrito no item 3.3.1.

3.5.2. Caracterização do gene *hsp10*

3.5.2.1. Purificação dos produtos de PCR

Os amplicons obtidos no item 3.5.1 foram precipitados utilizando PEG 8000 (Kusukawa *et al.*, 1990). O produto da reação de PCR foi transferido para um microtubo de 500 µl. Volume igual de solução de PEG 8000 (15%) foi adicionado e a mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Após centrifugar a

13.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado com a pipeta e descartado. 125 µl de etanol 80% gelado foram adicionados e centrifugou-se novamente a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com a pipeta. Realizou-se mais uma lavagem com etanol 80%, e o precipitado seco foi ressuspenso em água mili-Q.

3.5.2.2. Reações de seqüenciamento e análises *in silico*

O material obtido no item 3.5.2.1 foi submetido ao seqüenciamento, como descrito no item 3.3.5.1. As análises *in silico* foram realizadas de acordo com o item 3.3.5.2. Contudo, somente os programas “BLASTn”, “BLASTx” e Compute pI/Mw foram utilizados.

3.6. Clonagem do gene *hsp60* em vetor de expressão procarioto

3.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a expressão da proteína recombinante, a seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foi clonado no vetor de expressão procarioto pProEx-Hta. Para isso, os iniciadores foram desenhados a partir da seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Foram acrescentados sítios de restrição artificial às extremidades dos iniciadores. A seqüência destes, as temperaturas de anelamento, os sítios de restrição e o peso molecular do fragmento amplificado se encontram na tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros utilizados na PCR referentes ao vetor procarioto (pProEx-Hta).

Iniciador senso	5´- <u>GGATCC</u> GATGGCAAAGCTGATTGCA-3´ (<i>Bam</i> HI)
Iniciador antisenso	5´- <u>AAGCTT</u> TTAGTGGTGGTGGTGGTGGT-3´ (<i>Hind</i> III)
Temperatura de anelamento	58°C

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL contendo 20ng de DNA genômico, 2pmoles de cada iniciador, tampão de PCR 1X II (20mM Tris-HCL pH8,4; 50mM KCl; 1,5mM de MgCl₂; 200µM dNTPs) e 1U de AccuPrimeTM Taq DNA polimerase. A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando as seguintes condições: primeira desnaturação à 95°C durante 5 minutos, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto; anelamento durante 40 segundos; extensão a 68°C durante 2 minutos e 30 seg e extensão final por 7 minutos a 68°C.

3.6.2. Purificação do fragmento de DNA

O fragmento de DNA correspondente ao gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foi recuperado do gel de agarose e purificados de acordo com 3.4.2.

3.6.3. Clonagem em vetor pTOPO

O fragmento correspondente ao gene *hsp60* purificado foi então submetido à clonagem no vetor pTOPO de acordo com o item 3.4.3.

3.6.4. Transformação em *E. coli* TOP10

O produto de ligação obtido no item 3.6.3. foi transformado em *E. coli* TOP10 de acordo com o item 3.4.4.2.

3.6.5. Sub-clonagem no vetor de expressão procarioto

3.6.5.1. Digestão enzimática

Para a sub-clonagem no vetor de expressão procarioto, inicialmente foi realizada extração e purificação por *minipreparações* do vetor de expressão (pProEX-Hta) e do vetor contendo o inserto referente ao gene *hsp60* (e pTOPO:*hsp60p*). Estes foram submetidos a uma digestão dupla com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen), de forma a gerar extremidades coesivas. As reações foram realizadas para um volume final de 20 µL. Os produtos resultantes da digestão enzimática foram analisados por resolução eletroforética de acordo com item 3.3.1.

3.6.5.2. Purificação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA foram recuperados do gel de agarose e purificados de acordo com o item 3.4.2.

3.6.5.3. Clonagem da seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* nos vetores de expressão procarioto

Os insertos referentes ao gene *hsp60* e os fragmentos referentes à digestão enzimática dos vetores procarioto e eucariotos foram submetidos a uma reação de ligação *in vitro*. Cada reação foi realizada com a enzima T4 DNA polimerase (Invitrogen) à temperatura de 16°C durante 16 horas. As reações utilizaram uma proporção inserto/vetor de 10/1 em um volume final de 20 µL.

3.6.5.4. Verificação da presença e tamanho dos insertos dos clones referentes aos plasmídeos recombinantes pProEx-Hta:*hsp60*

A verificação da presença e do tamanho do inserto foi realizada de acordo com o item 3.4.5.1. a 3.4.5.2., sendo que o programa da PCR e os iniciadores utilizados foram os mesmos do item 3.6.1. Para confirmar o tamanho do inserto, 500 ng de DNA foram duplamente digeridos com as enzimas *Apal* e *HindIII* (Invitrogen), em uma reação cujo volume final foi de 20 µL. A confirmação da seqüência codificadora referente ao inserto clonado foi realizado por sequenciamento e análises *in silico* com os programas “BLASTn” e “BLASTx”, de acordo com os itens 3.4.6.1 e 3.4.6.2.

3.7. Expressão e Purificação da Proteína Hsp60 Recombinante

3.7.1. Expressão da Proteína Hsp60 Recombinante

Para o experimento piloto de expressão, 0,3 mL de uma cultura saturada de *E. coli* TOP 10 contendo o plasmídeo pProEX:*hsp60* foram adicionados a 30 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi incubada a 120 rpm a

37°C. Após atingir a densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0.5, a cultura foi dividida em induzida, a qual acrescentou-se 0,6 mM de Isopropilthio- β -D-galactopyranoside (IPTG), e não induzida, que não recebeu modificações, de acordo com as recomendações do fabricante (GIBCO BRL). Os níveis de expressão também foram analisados após a indução com 1mM de IPTG. Para a cinética de expressão, amostras de 500 μ L de ambas as culturas foram coletadas de hora em hora durante 4 horas de expressão. Estas amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 7 minutos e o precipitado reservado para a análise da expressão da proteína recombinante. Os mesmos procedimentos foram adotados para a expressão a maior escala, que foi realizada em 500 mL de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL) durante 4 horas. Toda a cultura foi então centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C.

3.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras coletadas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras (SDS-PAGE), utilizando-se gel de separação a 12% (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras aplicadas no gel foram previamente ressuspendidas em Tampão de Amostra (0,0625M Tris-HCl pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.0005%, β -mercaptoetanol 2,5%) e em seguida aquecidas a 100°C por 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em Tampão Tris-glicina (25mM Tris base, pH 8.3, 250mM Glicina e SDS 0.1%) a 100 Volts. Para a detecção da proteína, foi utilizada a coloração azul brilhante de Comassie. O gel foi incubado sob agitação à temperatura ambiente por 16 horas

na solução corante (Metanol 50%, ácido acético 10%, e Comassie Brilliant Blue R-250 0.25%). Em seguida, o gel foi transferido para a Solução Descorante (Metanol 50%, Ácido Acético 10%) até que o padrão de bandas pudesse ser visualizado. Os padrões de peso molecular utilizados foram o BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen) e Protein Mixture (Armesham).

3.7.3. Isolamento da proteína recombinante Hsp60

3.7.3.1. Preparo da amostra para a purificação - lise e dosagem

Para a lise celular, o precipitado da cultura induzida foi ressuscitado em 35 mL de solução de lise (10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄, 0.5M NaCl e 10mM Imidazol pH 7.5). O material foi então submetido à sonicação. Foram realizados 3 pulsos ultrasônicos de amplitude de 30% e intervalos de 1 minuto. O lisado da expressão foi então centrifugado a 7.000 rpm a 4°C por 20 minutos. Como a proteína expressa se apresentava em corpúsculos de inclusão, o sobrenadante foi descartado e o precipitado recuperado e ressuscitado em 50 mL de Tampão de Corrida desnaturante (10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄, 0.5M NaCl e 10mM Imidazol e 8M de uréia pH 7.5).

A concentração protéica da amostra foi calculada pelo Método de Bradford. Em seguida, a amostra foi diluída em Tampão de Corrida Desnaturante para a concentração protéica final de 0.5 µg/µl, sendo em seguida filtrada em membrana de 0.45 µm (Whatman).

3.7.3.1.2. Purificação da proteína recombinante Hsp60

Hsp60 foi purificada por cromatografia líquida de afinidade ao níquel sob condições desnaturantes em HPLC (do inglês, High Performance Liquid Chromatography) (GE Healthcare) *Akta Explorer*. Para este propósito, foi utilizada uma coluna HisTrap Chelating HP de 1 mL (GE Healthcare) de 10mM NiSO₄.6H₂O. O programa utilizado para a purificação foi o recomendado pelo fabricante (GE Healthcare). Para a eluição da proteína, utilizou-se Tampão de Eluição Desnaturante (10mM Na₂HPO₄, 10mM NaH₂PO₄, 0.5M NaCl e 0.5M Imidazol e 8M de uréia pH 7.5). Todo o procedimento de purificação foi monitorado pela leitura da absorbância a 280nm.

3.7.3.1.3. Diálise da proteína recombinante Hsp60

A proteína Hsp60 recombinante purificada foi submetida à diálise em uma membrana com limite de exclusão de 6 a 8 kDa (Spectrum Medical Industries). A diálise foi realizada contra soluções de concentrações decrescentes de uréia (6M, 4M, 2M e 1M) diluída em solução salina fosfatada tamponada (PBS pH 7.2) e uma quinta solução contendo somente PBS. A membrana de diálise contendo a proteína purificada permaneceu imersa por 1 hora e 30 minutos em cada uma das soluções sob agitação a 4°C. Após a diálise, a proteína recuperada foi dosada pelo método de Bradford.

3.8. Caracterização funcional da proteína recombinante Hsp60

O teste de complementação gênica foi analisado a partir de dois fenótipos: pela capacidade de crescimento sob condições de estresse térmico e pela

capacidade de manter o crescimento do fago λ . Em estresse térmico, as linhagens de *E. coli* B178 e CG2241 foram transformadas de acordo com o item 4.4.4.2 com os plasmídeos pProEx-Hta e pProEx-Hta e pProEX-Hta:*hsp*, respectivamente, e foram cultivadas em meio LB suplementado com ampicilina. Estas culturas foram cultivadas em meio LB caldo e a expressão da proteína recombinante, bem como a sua visualização em gel de poliacrilamida, foram realizadas de acordo com os itens 4.7.1 e 4.7.2, sendo que a concentração de IPTG utilizada foi de 0,1mM. Alíquotas de 3 μ l destas culturas induzidas foram plaqueadas em meio LB ágar, com e sem 0,1 mM IPTG. As placas foram incubadas a 30 e 42°C.

Para avaliar o crescimento do fago λ clb2, diluições seriadas deste foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina e com ou sem a adição de 0,1mM IPTG. Nestes meios, haviam culturas das bactérias transformadas com os plasmídeos pProEx-Hta e pProEx-Hta:*hsp60* (B178[pProEX], groEL44[pProEX-Hta] e groEL44[pProEx-Hta:*hsp60*]). Estas placas foram então incubadas a 30°C por 16 horas.

3.9. Imunizações com a proteína recombinante Hsp60

3.9.1. Animais

Antes de iniciar o processo de imunização, camundongos BALB/c de 5 a 6 semanas obtidos na Universidade Federal de Minas Gerais foram vermifugados com ivermectina 1%. Para isso, os animais receberam por 10 dias o produto em água filtrada e, posteriormente, permaneceram em descanso por 10 dias

recebendo apenas água filtrada. Para o processo de imunização, foram utilizados grupos de 5 animais.

A escala de imunização consistiu de 3 doses de imunização por via subcutânea com intervalos de 15 dias. O grupo controle foi imunizado com 100 µL de PBS emulsificado em 100µL de adjuvante. Ao grupo imunizado com a proteína recombinante, administrou-se 25 µg da proteína diluída em 100 µL de PBS, solução emulsificada em 100 µL de adjuvante. O Adjuvante Completo de Freud (CFA – Sigma) foi utilizado na primeira dose e o Adjuvante Incompleto de Freud (IFA – Sigma) nas segundas e terceiras doses.

3.9.2. Coleta de sangue

As coletas de sangue foram realizadas com 14, 28 e 42 dias após primeira imunização. O sangue foi retirado do plexo retro-orbital dos camundongos com o auxílio de pipetas Pasteur. Para obter o soro, o sangue coagulado foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. O soro resultante foi estocado a –20°C.

3.9.3. Desafio e infecção dos animais

Os camundongos imunizados com a vacina de subunidade protéica foram desafiados com 10^6 UFC (unidades formadoras de colônias) de a linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis* Pus 6 vinte e um dias após a terceira imunização. A via de infecção utilizada foi a intra-peritoneal.

Além dos camundongos, caprinos foram infectados experimentalmente com 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC da linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* Pus 6 por via

subcutânea. Estes animais, pertencentes à Indústria Vallée, foram amostrados e utilizados em experimentos de caracterização da resposta humoral em relação à proteína recombinante.

3.9.4. Caracterização da resposta imunológica

3.9.4.1. Caracterização do perfil da resposta humoral

3.9.4.1.1. Detecção de imunoglobulinas anti-Hsp60 a partir das amostras de soro dos animais imunizados com a proteína recombinante e de caprinos infectados experimentalmente

O soro de camundongos imunizados com a proteína recombinante e de caprinos imunizados com a linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* Pus 6 foi utilizado em ensaios imunoenzimáticos do tipo indireto para a detecção de imunoglobulinas anti-Hsp60. Para este propósito, placas de 96 poços de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram sensibilizadas com a proteína recombinante Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*. Para isto, adicionou-se a cada poço alíquotas de 100 µL da proteína purificada, na concentração de 5µg/mL diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9.6. As placas permaneceram a 4°C por 18 horas. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS- T20 (PBS 1X pH 7.4; Tween 20) e bloqueados com 250 µL/poço de PBS-T20 10% soro fetal bovino por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T20. Amostras dos soros de camundongos e de caprinos na diluição de 1:100 e 1:50, respectivamente, foram adicionados às placas em duplicatas 100 µL/poço. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente e 3

lavagens com PBS-T20, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo secundário conjugado à peroxidase, anti-mouse-IgG-HRP, anti-mouse-IgG1-HRP, anti-mouse-IgG2a-HRP e anti-goat-IgG (Southern Biotechnology Associates) nas diluições de 1:5.000, 1:5.000, 1:2.000 e 1:10.000 respectivamente. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente e 3 lavagens com PBS-T20, 100 µL/poço de solução reveladora (200pmoles orto-fenilenodiamina [OPD, Sigma] diluído em 50 mL de tampão citrato-fosfato pH. 5 0,05% H₂O₂). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL da solução de parada contendo 6% de ácido sulfúrico. A absorbância foi medida a 492nm utilizando um leitor de placas de ELISA (BioRad, Hercules, CA).

3.9.4.1.2. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através dos testes ANOVA post hoc Turkey e “t” de student não pareado utilizando o software GraphPad Prism. Foram considerados significativos os valores de P<0,05.

3.9.4.2. Caracterização do perfil da resposta celular

3.9.4.2.1. Cultura de esplenócitos

Para avaliar a resposta após a imunização com a proteína recombinante Hsp60, um grupo de 5 camundongos BALB/c foi sacrificado por deslocamento cervical 15 dias após a terceira imunização. O baço destes animais foi macerado e os esplenócitos assim obtidos foram homogeneizados em 35 mL de solução salina e então submetidas a 1.200 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a lise das hemácias,

o sobrenadante foi então descartado e o precipitado ressuspenso em 9 mL de água apirogênica. A solução foi rapidamente homogeneizada e então 1 mL de PBS 10X estéril foi acrescentado; a solução foi então homogeneizada e completou-se o volume de 35 mL com solução salina. A solução foi centrifugada a 1.200 rpm por 10 minutos a 4°C. Os esplenócitos foram então lavados mais duas vezes com solução salina estéril e apirogênica e, então, diluídas para uma concentração final de 1×10^6 /poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, penicilina G sódica 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL. Inicialmente, as células foram incubadas com 2 µg/poço de polimixina B (Sigma). As microculturas de esplenócitos foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos. Em seguida, as células foram então incubadas com meio RPMI 1640 (controle negativo), Concanavalina A 1 µg/poço (controle positivo), rHsp60 50µg/mL e com Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* purificado (Sigma) na concentração de 2.5ng/mL (mesma concentração de LPS encontrada em 50ug/mL da proteína recombinante). As microculturas de esplenócitos foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A mesma concentração de polimixina foi adicionada novamente a cultura após decorridas 12 e 24 horas da adição desta substância.

Os sobrenadantes das microculturas foram coletados após 24 horas para as células estimuladas com meio RPMI e concanavalina A e 48 horas ou 72 horas para as células estimuladas com Meio RPMI, rHsp60 e LPS. Após o período de estimulação, os sobrenadantes das culturas foram armazenados a - 70°C. Os

níveis de TNF- α e IL-4 foram medidos a partir dos sobrenadantes coletados após 48 horas e os de IFN- γ e IL-10 pós 72 horas de estimulação.

3.9.4.2.2. Detecção de citocinas

A produção de citocinas a partir dos esplenócitos pré-sensibilizados de camundongos imunizados foi avaliada através de ensaio imunoenzimático de captura. A dosagem dos níveis de citocinas foi realizada com o Kit Opteia (BD), de acordo com as instruções do fabricante. A densidade ótica foi realizada em leitor automático de ELISA (Biorad), utilizando o comprimento de onda de 450nm.

3.9.5. Análise da proteção

A proteção conferida pelo processo de imunização dos camundongos foi avaliada de acordo com a taxa de sobrevivência dos animais vacinados. Para isso, os animais imunizados com a proteína recombinante associada ao adjuvante de Freund foram comparados aos imunizados somente com PBS associado ao adjuvante de Freund.

3.10. Clonagem do gene *hsp60* em vetor de expressão eucarioto

3.4.10.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a construção da vacina de DNA, a seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foi clonado no vetor de expressão eucarioto pVAX1. Para isso, os iniciadores foram desenhados a partir da seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Foram acrescentados sítios de restrição artificial às extremidades dos mesmos. Foi adicionada ainda a

seqüência de Kozak ACCATGG, de acordo com as recomendações do fabricante do vetor pVAX1 (Invitrogen), ao iniciador senso. As seqüências dos iniciadores, as temperaturas de anelamento, os sítios de restrição e o peso molecular do fragmento amplificado se encontram na tabela 6.

Tabela 7: Parâmetros utilizados na PCR referente a clonagem do gene *hsp60* no vetor de expressão eucarioto (pVAX1).

Iniciador senso	5'- <u>AAGCTT</u> ACCATGGCAAAGATTGCATT-3' (<i>Hind</i> III)
Iniciador anti-senso	5'- <u>GGATCCT</u> TAGTGGTGGTGGTGGTGGT-3' (<i>Bam</i> HI)
Temperatura de anelamento	62°C

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL contendo 20ng de DNA genômico, 1pmole de cada iniciador, tampão de PCR 1X II (20mM Tris-HCL pH. 8,4; 50mM KCl; 1,5mM de MgCl₂; 200µM dNTPs) e 1U de AccuPrime TM Taq DNA polimerase. A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), utilizando as seguintes condições: primeira desnaturação à 95°C durante 5 minutos, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto; anelamento durante 40 segundos; extensão a 68°C durante 2 minutos e 30 seg e extensão final por 7 minutos a 68°C.

3.10.2. Purificação do fragmento de DNA

O fragmento de DNA correspondente ao gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foi recuperado do gel de agarose e purificados de acordo com 3.4.2.

3.10.3. Clonagem em vetor pTOPO

O fragmento correspondente ao gene *hsp60* purificado foi então submetido à clonagem no vetor pTOPO de acordo com o item 3.4.3.

3.10.4. Transformação em *E. coli* TOP10

O produto de ligação obtido no item 3.10.3. foi transformado em *E. coli* TOP10 de acordo com o item 3.4.4.2.

3.10.5. Sub-clonagem no vetor de expressão eucarioto

3.10.5.1. Digestão enzimática

Para a sub-clonagem no vetor de expressão eucarioto, inicialmente foi realizada extração e purificação por *minipreparações* do vetor de expressão (pVAX1) e do vetor contendo o inserto referente ao gene *hsp60* (pTOPO:*hsp60e*). Estes foram submetidos a uma digestão dupla com as enzimas *HindIII* e *BamHI* de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen), de forma a gerar extremidades coesivas. As reações foram realizadas para um volume final de 20 μ L. Os produtos resultantes da digestão enzimática foram analisados por resolução eletroforética de acordo com item 3.3.9.

3.10.5.2. Purificação dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA foram recuperados do gel de agarose e purificados de acordo com o item 3.4.2.

3.10.5.3. Clonagem da seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* nos vetores de expressão eucarioto

Os insertos referentes ao gene *hsp60* e os fragmentos referentes à digestão enzimática do vetor eucarioto foram submetidos a uma reação de ligação, de acordo com o item 3.6.4.3.

3.10.5.4. Verificação da presença e tamanho dos insertos dos clones referentes aos plasmídeos recombinantes pVAX1:*hsp60*

A verificação da presença e do tamanho do inserto foi realizada de acordo com os itens 3.4.5.1. a 3.4.5.2., sendo que o programa da PCR e os iniciadores utilizados foram os mesmos do item 4.10.1. Para confirmar o tamanho do inserto, 500ng de DNA foram duplamente digeridos com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (Invitrogen), em uma reação cujo volume final foi de 20 µL. A confirmação da seqüência codificadora referente ao inserto clonado foi realizado por sequenciamento e análises *in silico* com os programas “BLASTn” e “BLASTx, de acordo com os itens 3.4.6.1 e 3.4.6.2.

3.10.6. Isolamento e purificação dos vetores utilizados na imunização gênica

Os vetores pVAX1 e pVAX1:*hsp60* foram isolados e purificados utilizando o Kit EndoFree Plasmid de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen,

Valencia, CA). A concentração e pureza do DNA genômico foi estimada após leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, e também através de resolução eletroforética, de acordo com o item 3.3.1.

3.11. Imunização com a vacina de DNA

3.11.1. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, os quais foram submetidos ao mesmo tratamento descrito no item 3.9.1.

3.11.2. Imunização

Quanto à escala de imunização, os animais foram imunizados inicialmente com 10 μ M de cardiotoxina. Cada animal recebeu 50 μ L em cada quadríceps por via intra-muscular. A cardiotoxina foi administrada 5 dias antes de iniciar os processos de imunização com a vacina de DNA.

A imunização gênica foi realizada com 2 grupos. Um grupo recebeu o vetor pVAX1 contendo a seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*; o grupo controle foi imunizado com o vetor pVAX1, sem o inserto. Foram realizadas 4 imunizações com intervalo de 15 dias. A dose administrada foi de 100 μ g por animal; 50 μ g (em um volume de 50 μ L), por via intra-muscular, em cada quadríceps do animal.

3.11.3. Coleta de sangue

As coletas de sangue foram assim como descrito no item 3.10.2. nos dias 14, 28, 42 e 56.

3.11.4. Desafio e infecção dos animais

Os camundongos imunizados com a vacina de DNA foram desafiados de acordo com o item 3.9.3.

3.11.5. Caracterização da resposta imunológica.

3.11.5.1. Caracterização do perfil da resposta humoral

3.11.5.1.1. Detecção de imunoglobulinas anti-Hsp60

A resposta humoral dos animais imunizados com a vacina de DNA foi analisada da mesma maneira que os animais imunizados com a proteína recombinante, de acordo com o item 3.9.1.1.

3.11.5.1.2. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com o item 3.9.4.1.2.

3.11.6. Análise da proteção

A proteção conferida pelo processo de imunização gênica foi avaliada de acordo com o item 3.9.5. A comparação foi realizada entre o grupo controle (animais imunizados com pVAX1) e vacinados (imunizados com pVAX1:*hsp60*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. PARTE 1
Isolamento, clonagem e caracterização
molecular do gene *hsp60* e do seu operon

4.1.1. Isolamento e clonagem do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*

O primeiro passo deste trabalho de dissertação consistiu na tentativa de isolar o gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Com este intuito e considerando que as Hsps são bastante conservadas tanto em nível de nucleotídeo como de aminoácidos, adotou-se como estratégia a utilização da técnica de PCR. Os pares de iniciadores foram desenhados de forma complementar à seqüência codificadora do gene *hsp60* de *C. diphtheriae*, já que segundo Dorella *et al.* (2006), esta última é uma das bactérias mais próximas taxonomicamente da *C. pseudotuberculosis*. Foi verificada a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1630 pb (Fig. 2), assim como esperado para o gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Em seguida, este fragmento de DNA foi então submetido à clonagem no vetor TOPO:Blunt para posterior análise.

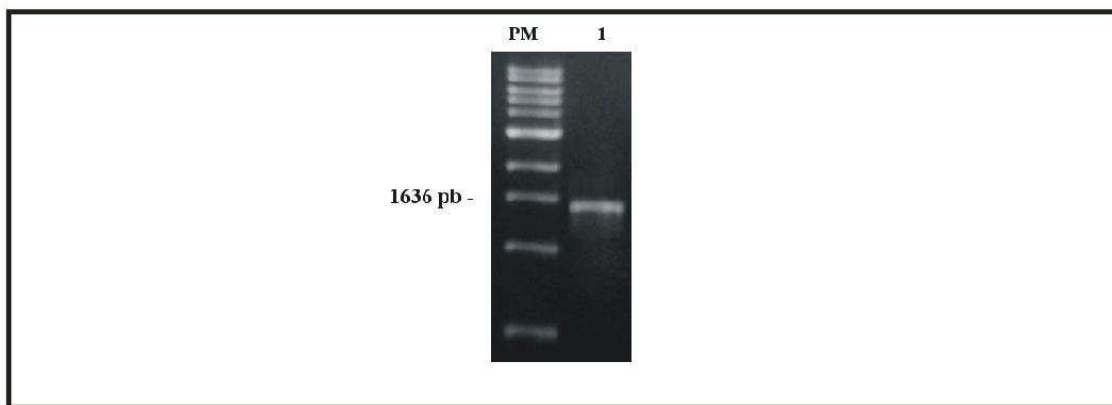


Figura 2: Amplificação do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Gel de agarose a 1% mostrando o produto da reação de amplificação, a qual teve como molde o DNA genômico da linhagem virulenta T1. PM: padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (invitrogen); Canaleta 1: amplificação do gene *hsp60*

4.1.2. Caracterização molecular do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* através da técnica de seqüenciamento e por análises *in silico*

Para a caracterização molecular do suposto gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*, primeiramente o DNA plasmidiano do clone contendo o vetor pTOPO:*hsp60* foi isolado. Para confirmar se o fragmento clonado correspondia à seqüência codificadora do gene *hsp60*, a amostra foi seqüenciada. Em seguida, foram desenhados iniciadores internos e a seqüência completa foi obtida. Cada fita então foi seqüenciada no mínimo 3 vezes. A seqüência nucleotídica completa do gene *hsp60* está representada na figura 3.

```
ATGGCAAAGCTGATTGCATTCAACCAGGAAGCCCGTGAAGGCATCCTGAAGGGTGTGGACACGCTGGCTA
ATGCAGTAAAAGTAAACGCTTGGTCCCCGTGGACGCAACGTGGTACTGGAAAAGCCCTTGGTAGCCCCAC
GGTTACCAACGATGGCGTGACTATCGCCCGCGAAATGACGTTGAGGATCGCTTTGAAAACCTCGGCGTA
CA3CTTCTGAAATCGGTTCCCGTAAAGACCAACGATATTGCTGCGCAGCGCACACCACCCGAACCGCTGC
TGGCCCAAGCAGTTATTACAGAGGGCTTGC3CAACGTTGCAGCTGGGGCTAATCCTGTGASCTGAACCG
AGGCATCCTTGGCGCAGCTGATAAAGCCGTGGAGAAGCTAGGCGAGCGTGCAGCGGAAGTAGCCTCTGCC
GCAGACATTGCCAACGTAGCCACTGTTTCTTCTCGCGATGCTGAGATCGGTGACATGGTCGCCGACGAA
TGGAAAAGTGGGCAAGGACGGTGTGGTAAAGGTTGAAGAGTCTCAGTCCATCGAGTCTTACCTTGATGT
GACCGAAGGAGTGCCTTTGACAAGGGCTACCTATCTCCGTACTTCATCACCGACACCGACTCTCAACGA
GCCGAGCTAGATGATCCGTACATTTCTCCTC3TACGGAATAAGATCTCCTCGCTGCCGGACTTCCTGCCTT
TGCTGGAAAAGACAGTCGAAGCGAACAAGCCGGTCTTATCATCGCGGAAGACGTAGAGGGTGAGCCTCT
GCAGACTCTCGTGGTGAACCTCCATCCGGAAGACGCTGCGCGCTGTTGCCGTGAAGTCTCCGTATTTTGGT
GAGCGTCGTAAAGCATTCAATGGACGACCTC3CAGTGGTTACTAATGCCACCGTGGTGGACCCAGAGGTGG
GCATTAACCTGAATGAAGCGGGCGTGCAGGTATTTGGTACCCTCGTCCGCTCACTGTAACCAAAGACGA
GACCATCATCGTGGATGGCGCGGAACTTCCGAGGCGGTGGAGAATCGCCCTCAACAAATCCGTCGCGAG
ATCGAAAACACGGACTCCAGCTGGGATCGTGA AAAAGCTGAGGAGCGCCTGGCCAAGCTCTCTGGTGGCG
TC3CTGTGATTAAGTCCGTGCAGCCACGGAAACCGAGGTCTCCGAGCGTAAACTGCGTGTGGAAGACGC
CATCAATGCTGCCCGTGCACCGECTCAGGAGGGCGTTATCGCGGGCGGTGECTCCGCGCTTGTGCAGATT
GCCAAGGAAGTGC3CGTATACGCCGAAGAGTTTGAAGGCGACGCTAAGGTCGGCGTCAACGCTTTGGCCA
ATGCCTTGAGCAAGCCTGCTTATTGGATCGCCGACAACGCAGGTCTCGACCGTGCAGTTGTGGTCTCTAA
GATCGCTGATTTGCCTAACCGGGAAGGCTTCAACGCTGCAACTTTGGAGTACGGGAACCTGATTGAACAG
GGCATTATTGATCCTGTAAAGGTCAACCACTCTGCAGTGGTGAACGCAACCTCCGTTGCCCGGATGGTTC
TGACCACCGAGGCATCTGTTGTGGAGAAGCCTGTTGAGGCTAAGCCACAGGCTGGTGGGCATCACCACCA
CCATCACCACC
```

Figura 3: Seqüência nucleotídica do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Em amarelo: códon de início ATG; em vermelho: códon de parada TAA.

A seqüência nucleotídica referente ao gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* é composta de 1626 pb e foi depositada no GenBank com o número de acesso

AY_781285. O tamanho obtido está de acordo com os de outras seqüências de *hsp60* de outras espécies bacterianas, como *C. glutamicum* (Barreiro *et al.*, 2004) e *Rhodococcus equi* (Vanniasinkam *et al.*, 2004). Estas características são ainda observadas em microorganismos filogeneticamente distantes, como as cianobactérias (Tanaka *et al.*, 1997).

Após o seqüenciamento, a seqüência nucleotídica do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* foi submetida a uma busca de similaridades. Com este propósito, utilizou-se o programa "BLASTn". As análises *in silico* demonstraram que esta seqüência é similar a de outros genes *hsp60* de diferentes microorganismos. Elas foram significativas com aquelas de microorganismos filogeneticamente mais próximas, especialmente com as de outras espécies do gênero *Corynebacterium* (Fig. 4).

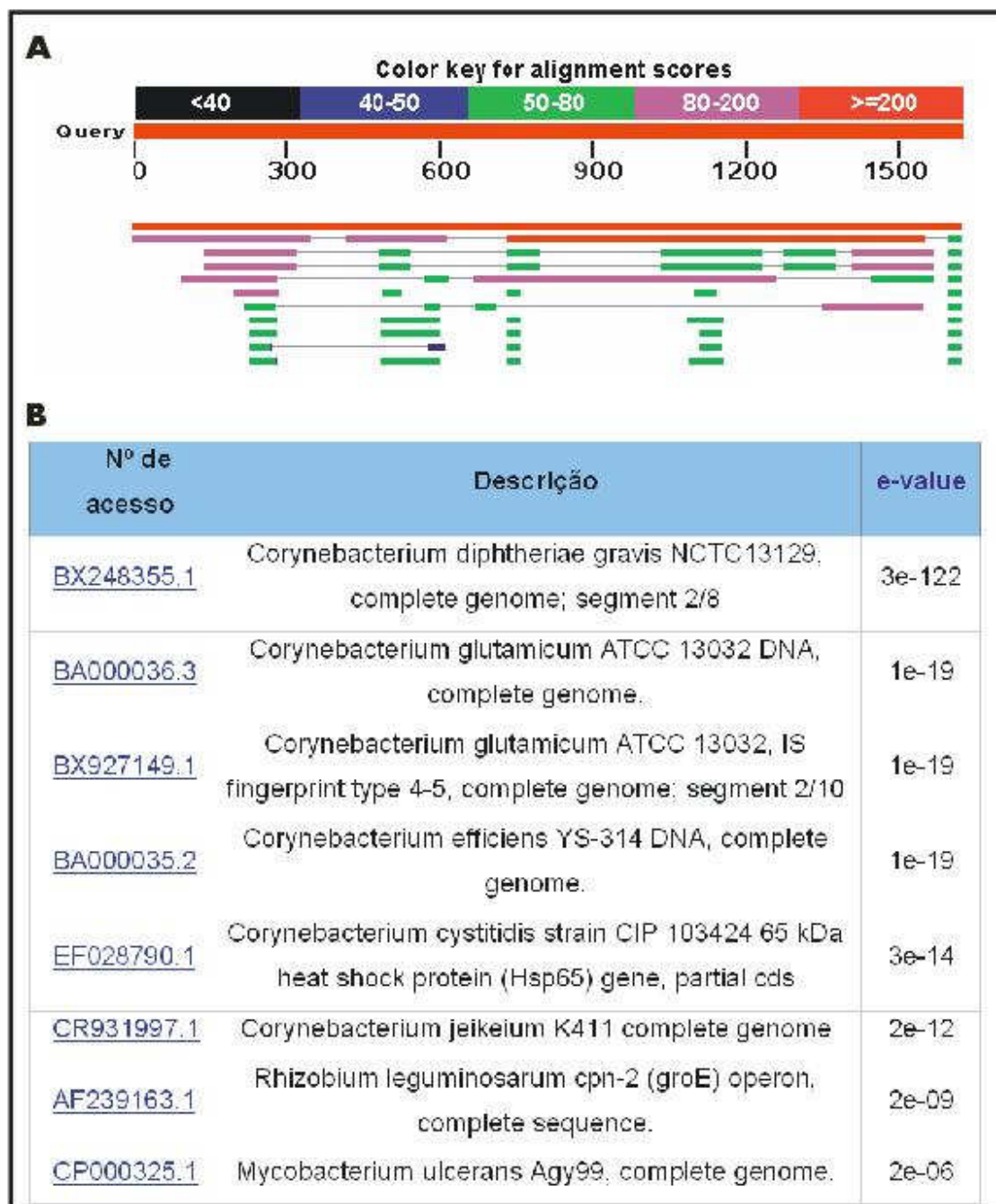


Figura 4: Resultado dos alinhamentos de maior similaridade em forma de gráfico (A) e tabelas com as suas informações respectivas geradas automaticamente pelo BLASTn (B).

A proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* é composta de 541 aminoácidos (Fig. 5), sendo que o peso molecular e o valor do ponto isoelétrico

(pI) preditos pelo Compute pI/Mw (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) foram de 57,4 kDa e 4,91, respectivamente.

```
MAKLIAFNQEAREGILKGVDTLANAVKVTLGPRGRNVVLEKAFGSPTVTNDGVTIAREIDVED  
RFENLGVQLVKSVAVKTNDIAGDGTTTATLLAQAVITEGLRNVAAGANPVELNRGILAAADK  
AVEKLGERRAAEVASAADIANVATVSSRDAEIGDMVAAAMEKVGKDGVVTVVEESQSIESYLDV  
TEGVSEFDKGYLSPYFITDTSQRAELDDPYILLVRNKISSLPDFLPLEKTVEANKPVLIIAEDVE  
GEPLQTLVVNSIRKTLRAVAVKSPYFGERRKAFMDDLAVVVTNATVVDPEVGINLNEAGVEVF  
GTARRVTVTKDETIIVDGAAGTSEAVENRRQQRREIENTDSSWDREKAEERLAKLSGGVAVIKV  
GAAETEVSERKLRVEDAINAARAAAQEGVIAAGGSALVQIAKELRVYAEEFEGDAKVGVNA  
LANALSKPAYWIADNAGLDGAVVVSKIADLPNGEGFNAAATLEYGNLIEQGIIDPVKVTHTSAVV  
NATSVARMVLTTEASVVEKPVAKPQAGGHHHHHHHH
```

Figura 5: Seqüência de aminoácidos do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. Em vermelho, está destacado o motivo composto de uma repetição de 8 histidinas na porção C-terminal da proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*.

Assim como a seqüência nucleotídica, a seqüência de aminoácidos foi submetida à busca de similaridades com todas as proteínas depositadas em bancos de dados. Com este intuito, utilizou-se o programa "BLASTx". Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* apresenta similaridade com seqüências de Hsp60 de diferentes microorganismos. Elas foram mais significativas com a de microorganismos filogeneticamente próximos e, principalmente, com as de outras espécies do gênero *Corynebacterium* (Fig. 6).

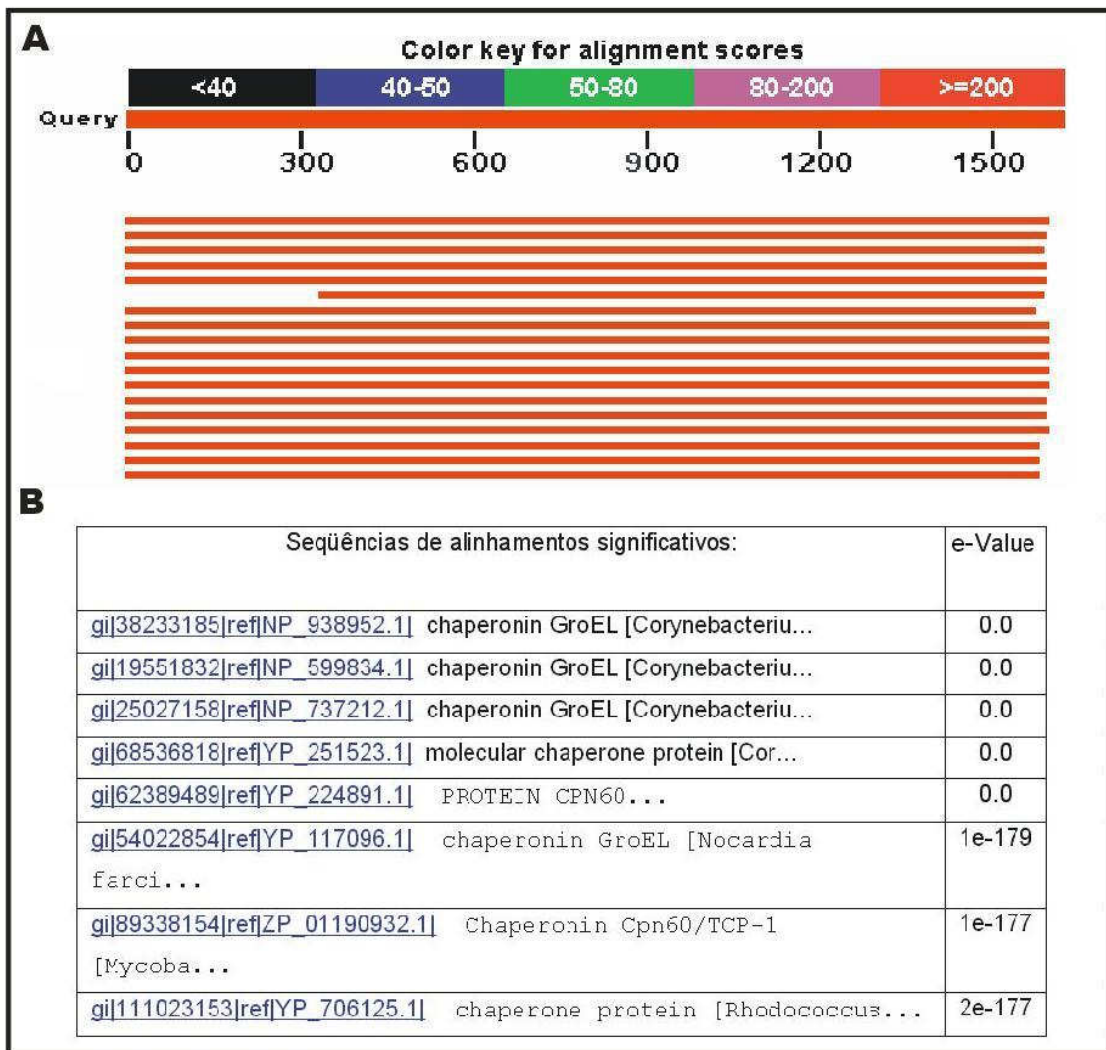


Figura 6: Resultado dos alinhamentos de maior similaridade em forma de gráfico (A) e tabelas com as suas informações respectivas geradas automaticamente pelo BLASTx (B).

Comparando os resultados obtidos com as análises *in silico* referentes à busca de similaridades da seqüência nucleotídica com a de aminoácidos entre as *Corynebacterium*, nota-se que a similaridade da seqüência de aminoácidos é mais significativa que a de nucleotídeos. Este fato reflete a alta conservação funcional

das proteínas Hsps entre as espécies, e justifica-se pelo uso diferencial de códons preferenciais entre as mesmas durante o processo de tradução de proteínas.

Um alinhamento foi realizado para predizer a identidade entre aminoácidos da Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* com as de outros microorganismos do grupo CMN, incluindo espécies patogênicas. Assim como os resultados obtidos no BLASTx, a maior identidade ocorreu entre espécies do gênero *Corynebacterium*; 89% e 82% de identidade com *C. diphtheriae* e *C. glutamicum*, respectivamente. Em relação a espécies de outros gêneros, a porcentagem obtida foi de aproximadamente 60%. A identidade foi relativamente maior se comparada ao gênero *Nocardia* (66,9%) que com o *Mycobacterium* (61%) (Fig. 7). A similaridade significativa entre as Hsp60 de outras espécies com importância em saúde pública como a *M. leprae* e a *M. tuberculosis* é interessante sob o ponto de vista da genômica comparativa e da escolha de antígenos vacinais. A alta similaridade sugere a possibilidade da conservação de epitopos.

Seq->	Cp1	Cdiph1	Cglu1	Mlep1	Mtb1	Nfar1
Cp1	ID	0,890	0,820	0,613	0,614	0,669
Cdiph1	0,890	ID	0,807	0,612	0,626	0,677
Cglu1	0,820	0,807	ID	0,628	0,623	0,678
Mlep1	0,613	0,612	0,628	ID	0,827	0,741
Mtb1	0,614	0,626	0,623	0,827	ID	0,756
Nfar1	0,669	0,677	0,678	0,741	0,756	ID

Figura 7: Matrix de identidade entre a proteína Hsp60 de espécies do grupo CMN. A identidade entre as proteínas Hsp60 de espécies pertencentes aos actinomicetos foi realizada com o auxílio do programa CLUSTAL W. *C. pseudotuberculosis* (Cp1); *C. diptheriae* (Cdiph1) (NP_938952); *C. glutamicum* (Cglu1) (NP_599834); *M. leprae* (Mlep1) (NP_301373); *M. tuberculosis* (Mtb1) (NP_217934); *Nocardia. faridiosas* (Nfar1) (YP_117096)

O alinhamento ainda permitiu comparar a conservação de aminoácidos por toda a extensão da proteína Hsp60. O resultado demonstra a existência de aminoácidos idênticos e similares por toda a seqüência da proteína. Apesar disso, as regiões que apresentam maior identidade estão presentes nas porções N e C-terminal (Fig. 8).

A região C-terminal da proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* apresenta um motivo que é caracterizado por uma repetição de 8 histidinas. Esta repetição é caracterísitica da cópia 1 da proteína Hsp60 de actinomicetos (Ojha *et al.*, 2005) (Fig. 9). O gene codificador desta proteína neste grupo se encontra organizado em um operon bicistrônico, o qual é composto por mais uma “ORF”, a correspondente ao gene *hsp10*.

Espécie	Aminoácidos	Nº de histidinas
cp1	KPVEAKPQAGGHHHHHHHH-	495
cd1	KPAAPAPEAG-HHHHHHH--	493
ml1	KPAKTEEHD-HHGHAH----	491
mt	KPAKAEDHDHHHGHAH----	493
rel	KPAEENEQQTGHGHS-----	491
st1	KKEEEEPAAGGHSHGHS--	495
nc1	KPEEEEPAAGGHHGHHGHHGHH	495
	* * * *	

Figura 9: Repetições de histidina presentes na porção C-terminal da proteína Hsp60 de actinomicetos cópia 1. Alinhamento pelo programa CLUSTAL W em relação à porção C-terminal da cópia 1 da proteína Hsp60 de bactérias pertencentes aos actinomicetos. As espécies utilizadas no alinhamento possuem entre 3 e 8 histidinas. *C. pseudotuberculosis* (cp1) (AAV48830); *C. diptheriae* (cd1) (NP_938952); *M. leprae* (ml1) (NP_301373); *M. tuberculosis* (mt) (NP_217934); *R. equi* (re1); *N. farcisdiolosas* (nc1) (YP_117096). O retângulo em vermelho destaca a repetição de histidinas

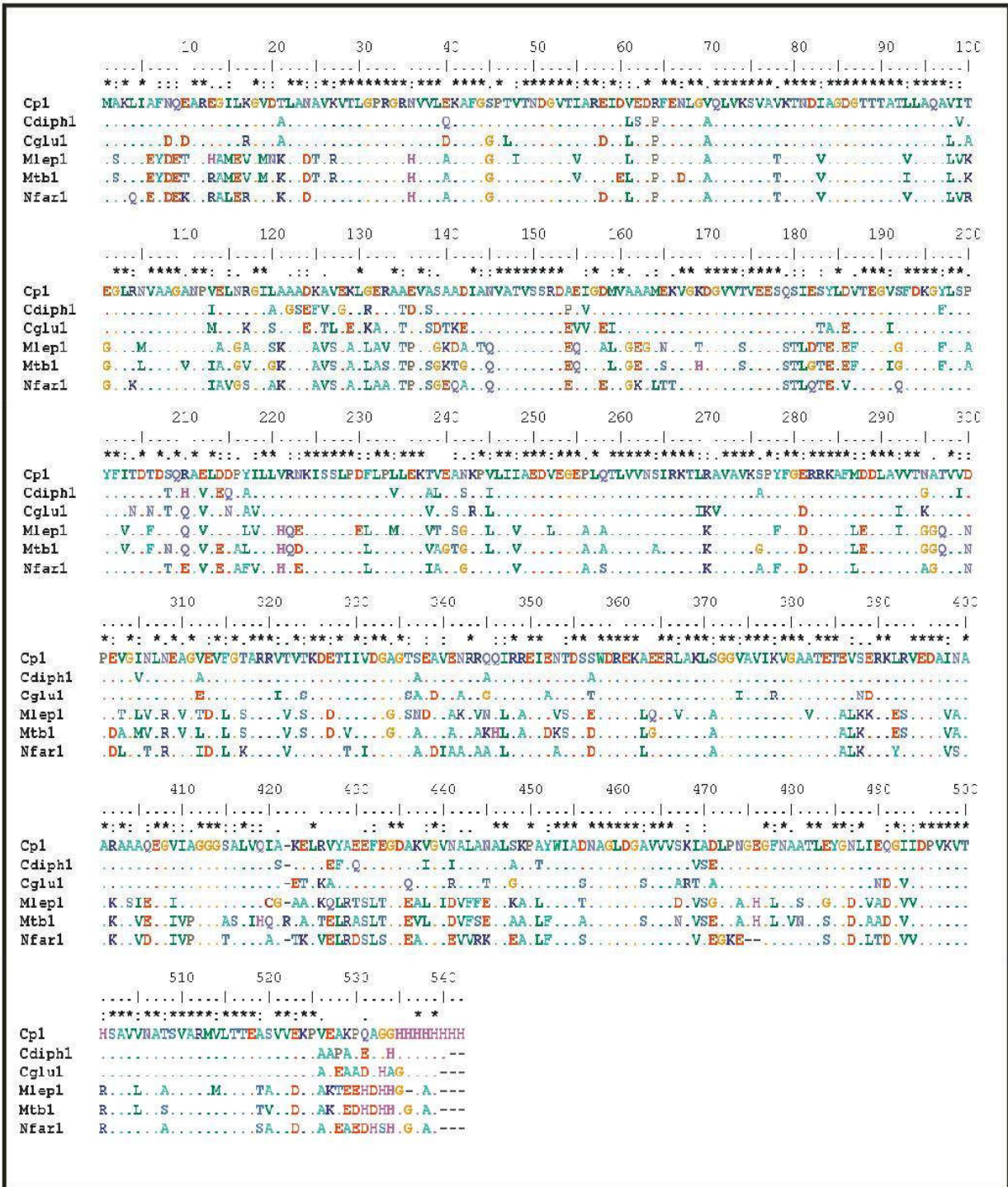


Figura 8: Alinhamento das seqüências de HSP60 de *C. pseudotuberculosis*. O alinhamento entre algumas espécies do grupo CMN foi realizado com o auxílio do programa CLUSTAL W. Cp1: *C. pseudotuberculosis*; Cdiph1: *C. diphteriae*; Cglu1: *C. glutamicum*; Mlep1: *M. leprae*; Mtb1: *M. tuberculosis*; Nfar1: *Nocardia fastidiosas*. Os asteriscos correspondem aos aminoácidos idênticos, os dois pontos são aminoácidos semelhantes quanto ao tamanho e carga e um ponto quando os aminoácidos são semelhantes em tamanho ou em carga; quando não há pontos, os aminoácidos são diferentes.

A repetição de histidinas é uma característica interessante dessas proteínas. De acordo com Mc Lennan *et al.* (1993), a porção C-terminal da maioria das Hsp60 apresentam uma repetição em tandem do motivo glicina-glicina-metionina (GGM). Apesar de a cópia 1 da Hsp60 de actinomicetos apresentar histidinas ao invés de GGM, a cópia 2 apresenta estes motivos (Fig. 10). As repetições de histidinas são observadas somente nos actinomicetos (Ojha *et al.*, 2005); não há em cianobactérias ou α -proteobactérias (Tanaka *et al.*, 1997). Isto confirma os dados obtidos pela análise *in silico* de que as Hsp60 são mais conservadas entre espécies filogeneticamente mais próximas (Eom *et al.*, 2005).

Espécie	Aminoácidos
re2	LLAAGINDPVKVT RSALQNAASIAALFLTTEAVVADKPEKAAA PMGDPPTGGNGGMDF- 471
nc2	LLAAGVADPVKVT RSALQNAASIAALFLTTEAVVADKPEKAAA PAGDPTGGNGGMDF- 471
m12	LLKAGVADPVKVT RSALQNAASIAAGLFLTTEAVVADKPEKTAAPASD PTGGNGGMDF- 471
mt2	LLAAGVADPVKVT RSALQNAASIAAGLFLTTEAVVADKPEKEKASVPG -GGDN GGMDF - 470
ce2	LMAAGINDPVKVT RSALQNAASIAALFLTTEAVVADKPPAGAA -MPGADE NGMGGF 477
cg2	LMAAGINDPVKVT RSALQNAASIAALFLTTEAVVADKPPAGAA MPGADE NGMGGF 478
cd2	LMAAGINDPVKVT RSALQNAASIAALFLTTEAVVADKPEPAAPA -MPGADE NGMG-F 476

Figura 10: Motivos GGM presentes na porção C-terminal da proteína Hsp60 de actinomicetos cópia 2. Alinhamento pelo programa CLUSTAL W referente à porção C-terminal da cópia 2 da proteína Hsp60 de bactérias pertencentes aos actinomicetos. *R. equi* (re2) (YP_706125.1); *N. farcinica* (nc2) (YP_121491.1); *M. leprae* (m12) (NP_301345.1); *M. tuberculosis* (mt2) (NP_214954.1); *C. efficiens* (ce2) (NP_739171); *C. glutamicum* (cg2) (NP_601912.1); *C. diptheriae* (cd2) (NP_940351). O retângulo em vermelho destaca a repetição do motivo GGM

A comparação de domínios entre as proteínas Hsp60 depositadas no banco de dados com a de *C. pseudotuberculosis* também demonstrou a alta conservação na porção N e C-terminal. Aliado a isso, ainda apresenta uma similaridade entre as Hsp60 de procaríotos com as de eucariotos (Fig. 11A). Além disso, a Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* ainda apresenta um domínio conservado relacionado com a

atividade de ATPase (Hennequin e col., 2001) (Fig. 11B) Este é um característica intrínseca destas chaperones moleculares.

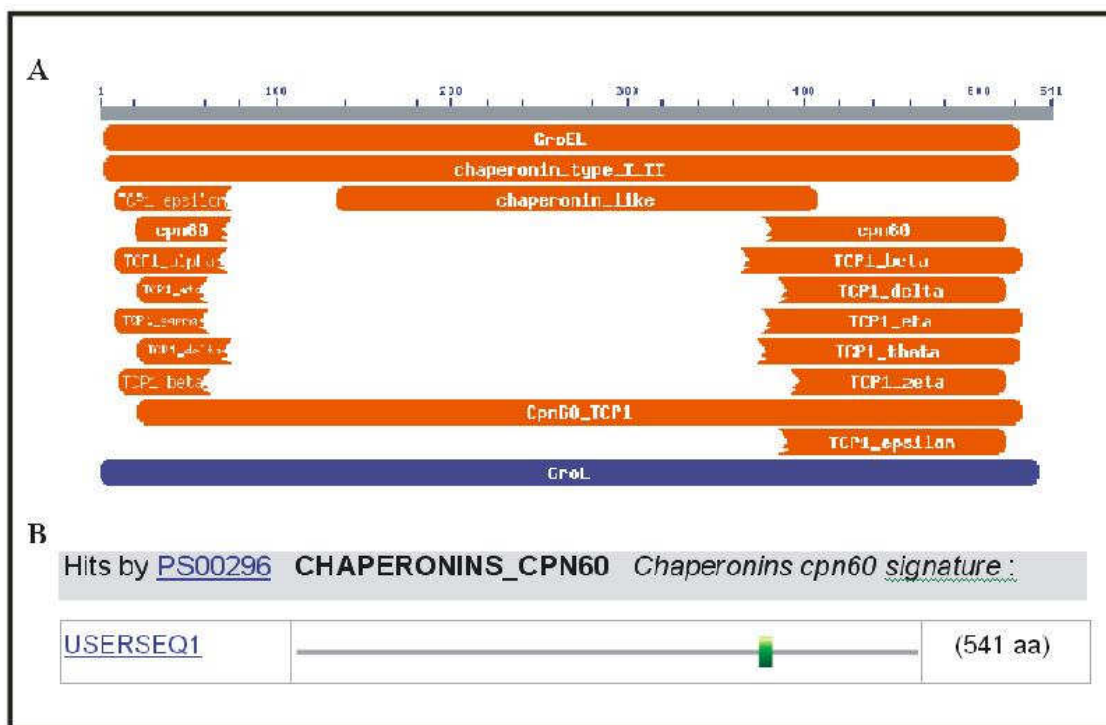


Figura 11: Análise dos domínios conservados presentes na seqüência da Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*. (A) os domínios de Hsps de organismos eucariotos e procariotos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); cpn60 corresponde a Hsp60 de organismos procariotos, sendo que os outros domínios são de Hsp60 de organismos eucariotos; (B) figura mostra a presença de um domínio conservado de atividade ATPase presente nesta família de proteínas; este domínio se encontra no terço final da proteína e corresponde aos nucleotídeos 403 a 414 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/prosite/ScanView.cgi>). As análises foram feitas através de alinhamentos entre seqüências presentes no banco de dados.

A análise de domínios também pôde ser analisada a partir da predição da estrutura secundária e terciária da Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*. A estrutura secundária foi predita de acordo com McGuffin *et al.* (2000) (Fig. 12) e é composta principalmente de alfa-hélices com algumas folhas beta. A mesma observação foi feita a partir da modelagem da Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* e da Hsp60 de *E.*

coli, sendo que esta é bem caracterizada (Fig. 13). As Hsp60 apresentam 3 domínios funcionalmente distintos: O domínio equatorial, um pequeno domínio intermediário e o apical. O equatorial fornece a base da estrutura e onde estão os domínios N e C terminais e é composto principalmente por alfa-hélix. O domínio apical é o de ligação aos substratos e à co-chaperonina. É uma estrutura de alta flexibilidade, o que permite que diferentes proteína em diferentes conformações possam se adequar às chaperones. O domínio intermediário é o menor dos 3 e está envolvido com a transmissão de mudanças alostéricas entre os dois domínios anteriores (Braig, 1998).

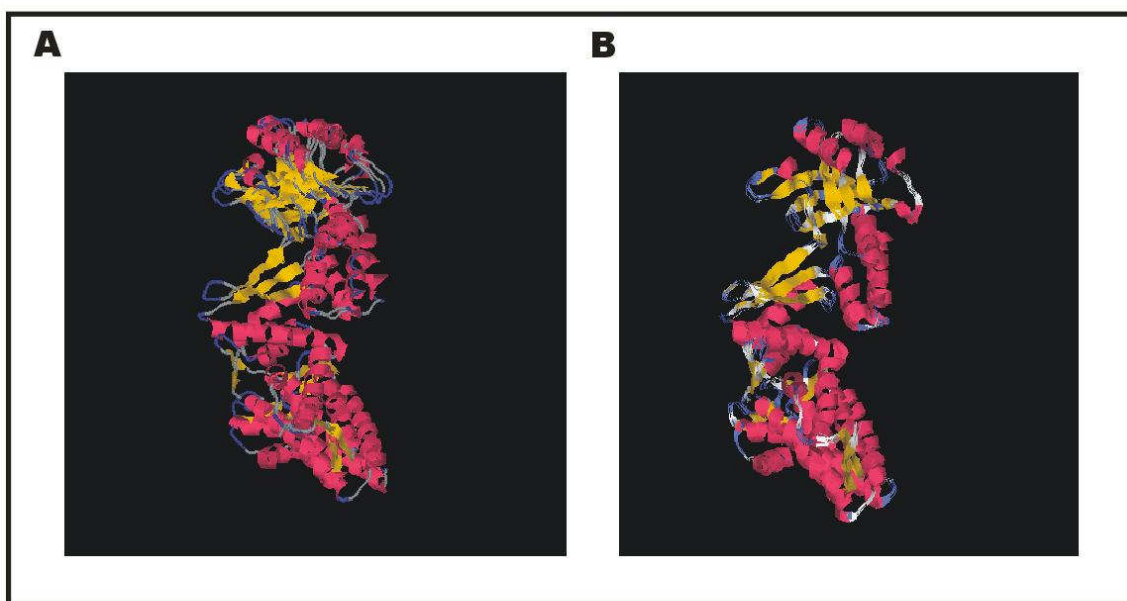


Figura 13: Modelagem da proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* (A) e de *E. coli* (B). A estrutura terciária das proteínas foi predita com o auxílio do programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expas.org/workspace/>).

4.1.3. Isolamento do gene *hsp10*

A cópia 1 da proteína Hsp60 do gênero *Corynebacterium* é distinguida da cópia 2 por certas características. Além da cauda de histidina, a cópia 1 se encontra organizada em operon. Este operon é constituído por 2 seqüências codificadoras: uma que codifica para a chaperonina Hsp60 e outra que codifica para a co-chaperonina Hsp10. Este operon é denominado GroE e é considerado como o mais conservado daqueles constituídos por genes que codificam as Hsps.

Na caracterização do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* isolado neste trabalho de dissertação, a seqüência de aminoácidos apresentou uma cauda de 8 histidinas na porção C-terminal. Esta característica sugere então que esta seja a cópia 1. Então, para caracterizar o gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*, o segundo passo consistiu em confirmar se esta cópia 1 está organizada em um operon.

Por ser o operon GroE muito conservado durante o processo evolutivo, adotou-se novamente como estratégia a amplificação da seqüência codificadora do gene *hsp10* pela técnica de PCR. O iniciador senso foi desenhado de acordo com a seqüência codificadora do gene *hsp10* de *C. diphtheriae* a partir do códon de início, que no caso é o GTG. O iniciador anti-senso foi desenhado de forma complementar a uma seqüência interna do gene *hsp60* já isolado. A análise em gel de agarose demonstrou a presença de um fragmento de aproximadamente 300 bp, como se pode observar na figura 14. Este é o peso molecular esperado para este fragmento, tendo por base o peso molecular do gene *hsp10* de *C. diphtheriae*.

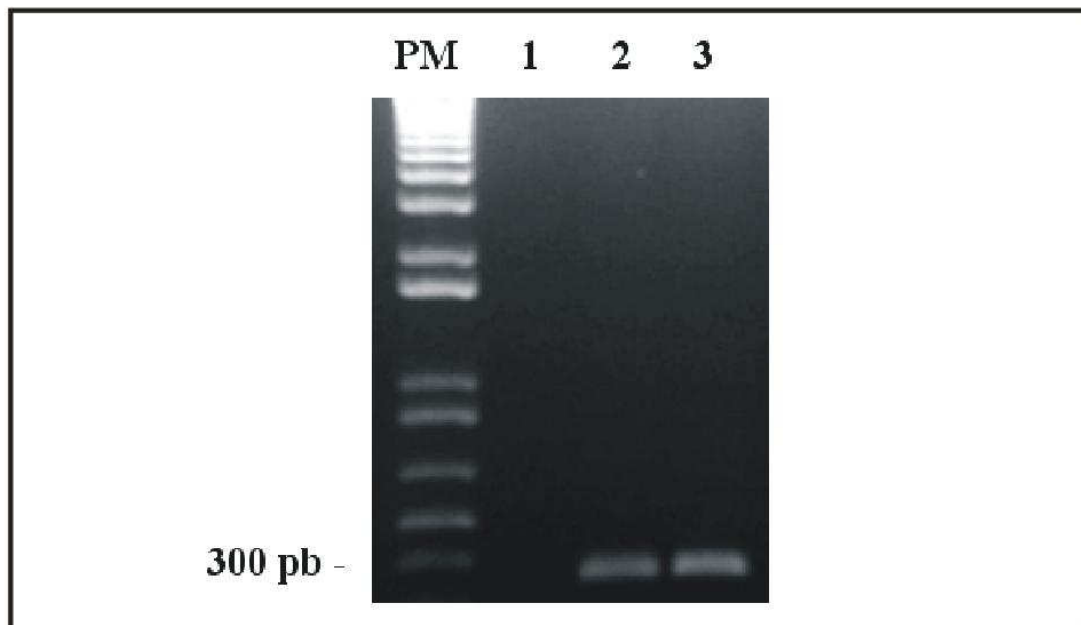


Figura 14: Amplificação do gene *hsp10* de *C. pseudotuberculosis*. Gel de agarose a 1% mostrando o produto da reação de amplificação, a qual teve como molde o DNA genômico da linhagem virulenta T1. PM: padrão de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (invitrogen); Canaleta 1: controle negativo; Canaleta 2 e 3: amplificação do gene *hsp10*.

4.1.4. Caracterização molecular do gene *hsp10* de *C. pseudotuberculosis* através da técnica de seqüenciamento e análises de bioinformática para confirmar a organização em operon do gene *hsp60*

Para a caracterização molecular do suposto gene *hsp10* de *C. pseudotuberculosis*, o produto de PCR foi seqüenciado para confirmar se o amplicon era a seqüência codificadora do gene *hsp10*. A seqüência nucleotídica é composta de 297 pb foi depositada no GenBank com o número de acesso DQ_869271. A estratégia utilizada demonstrou ainda que as seqüências

nucleotídicas do gene *hsp10* e *hsp60* estão separadas por 11 nucleotídeos e o códon iniciador é o GTG (Fig. 15). O peso molecular e o códon iniciador alternativo

são características conservadas entre o gene *hsp10* de outras espécies (Kim *et al.*, 2001). O códon de maior eficiência é o AUG, sendo que a eficiência da tradução cai pela metade quando o códon de início é o GUG (Lewin, 2004). Além disso, a característica da cópia 1 do gene *hsp60* dos actinomicetos é a organização gênica em um operon bicistrônico e a repetição de histidinas na porção C-terminal da proteína. Portanto, o gene *hsp60* isolado corresponde à cópia 1.

```
GTGGCTAACGTCAATATCAAGCCCCTTGAGGACCGCGTTCTTGTCCAGATCAGCGAGGCAGAGACCACCA  
CTGCATCTGGCCTGGTTATTCCAGATTCGGCTAAGGAAAAGCCACAAGAAGGTGTAGTTGTTGCAGCAGG  
TCCTGGCCGTTTTGACGGCGATGACCGGGTTCCATGGACATCAAGGAGGGCGACACCGTTGTGTTCTCC  
AAGTACGGCGGAACCGAGCTGAAGTACAACGGTGAGGAATACCTCCTACTCAACGCTCGCGACGTTCTCG  
CGATCATTGAGAAGTAAAGCGACTATCTATGSCAAAGCTGATTGCATTCAACCAGGAAGCCCGTGAAGGC  
ATCCTGGAAAAGAGGGAA
```

Figura 15: Seqüência nucleotídica do gene *hsp10* de *C. pseudotuberculosis*. O amplicon obtido após a reação de PCR foi precipitado e então submetido ao seqüenciamento. Para isso, foi utilizado o mesmo par de iniciadores da reação de amplificação deste gene. Em rosa: códon de início do suposto gene *hsp10* de *C. pseudotuberculosis*; em amarelo: espaço intergênico entre os genes *hsp10* e *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*; em verde: seqüência codificadora inicial do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*.

Após o seqüenciamento, a seqüência nucleotídica foi submetida a uma busca de similaridades. Com este objetivo, utilizou-se o programa “BLASTn”. As análises *in silico* demonstraram que a seqüência nucleotídica do gene *hsp10* de *C. pseudotuberculosis* apresenta similaridade com seqüências de *hsp10* de diferentes microorganismos. As similaridades foram significativas com as de microorganismos filogeneticamente mais próximas, principalmente com as de outras espécies do gênero *Corynebacterium* (Fig. 16).

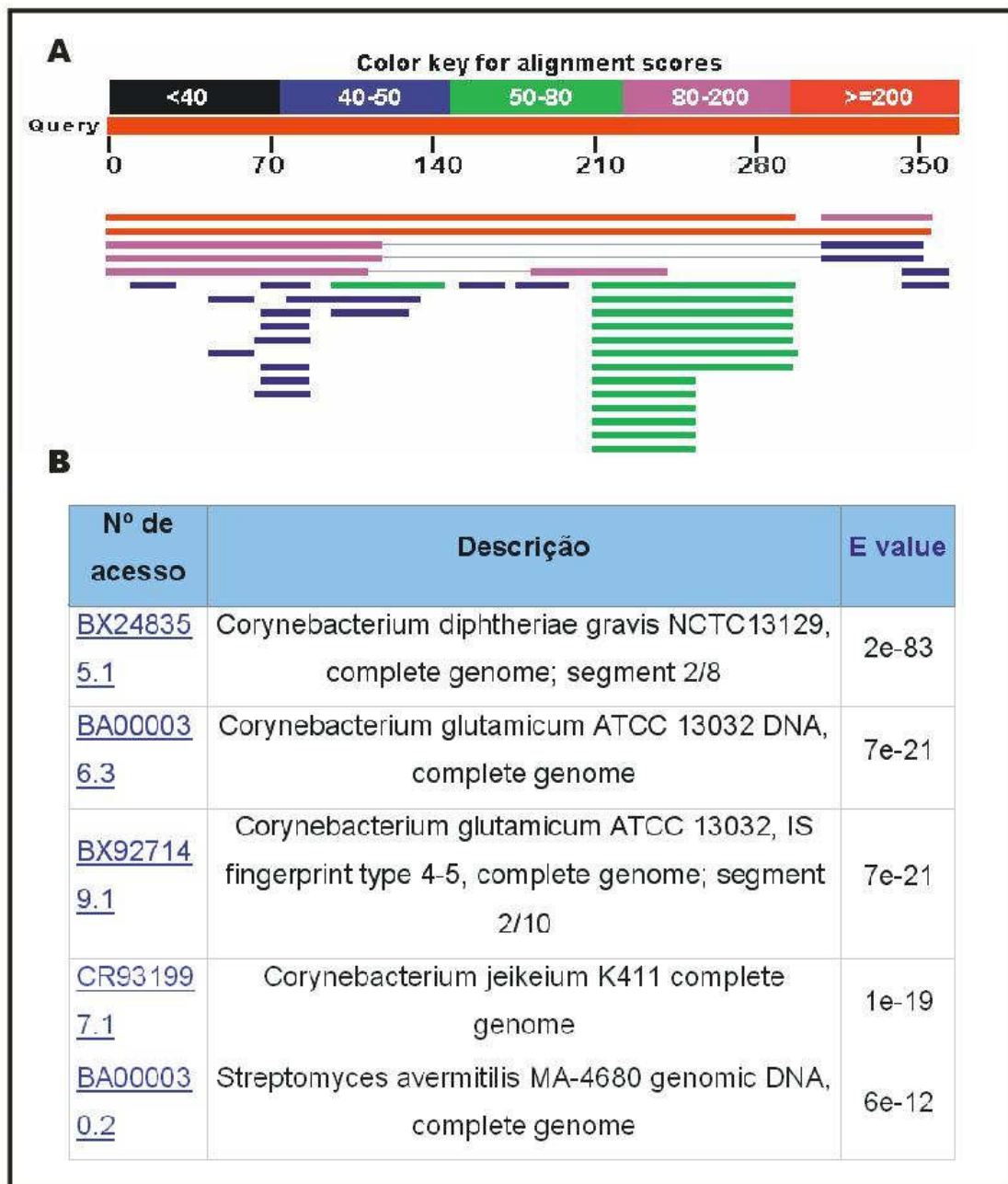


Figura 16: Resultado dos alinhamentos de maior similaridade em forma de gráfico (A) e tabelas com as suas informações respectivas geradas automaticamente pelo BLASTn (B).

A proteína Hsp10 de *C. pseudotuberculosis* é composta de 98 aminoácidos (Fig. 17), sendo que o peso molecular e o valor de pI preditos pelo Compute pI/Mw (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) foram de 10,6 kDa e 4,49,

respectivamente. Assim como a seqüência nucleotídica, a de aminoácidos foi submetida à busca de similaridades com outras proteínas Hsp10 pelo programa “BLASTx”.

```
MANVNIKPLEDRVLVQISEAETTTASGLVIPDSAKEKPQEGVVVAAGPGRFDGDDRVPMDIKEGDT  
VVFSKYGGTELKYNNGEYLLLNARDVLAIIK
```

Figura 17: Seqüência de aminoácidos do gene *hsp10* de *C. pseudotuberculosis*.

Os resultados demonstram que a seqüência de aminoácidos da proteína Hsp10 de *C. pseudotuberculosis* apresenta similaridade com seqüências de HSP10 de diferentes microorganismos. As similaridades foram significativas com aquelas de microorganismos filogeneticamente mais próximas. Contudo, ao contrário do observado para a proteína Hsp60, a maior similaridade verificada não foi entre as seqüências de aminoácidos de outras Hsp10 de espécies do gênero *Corynebacterium*. De acordo com Eom *et al.*, (2005), isto pode ser devido ao fato de que a proteína Hsp60 é mais espécie-específica que a proteína Hsp10. Por isso, os mesmos autores sugerem que esta proteína pode ser mais precisa para predizer relações filogenéticas se comparada a Hsp60 (fig. 18).

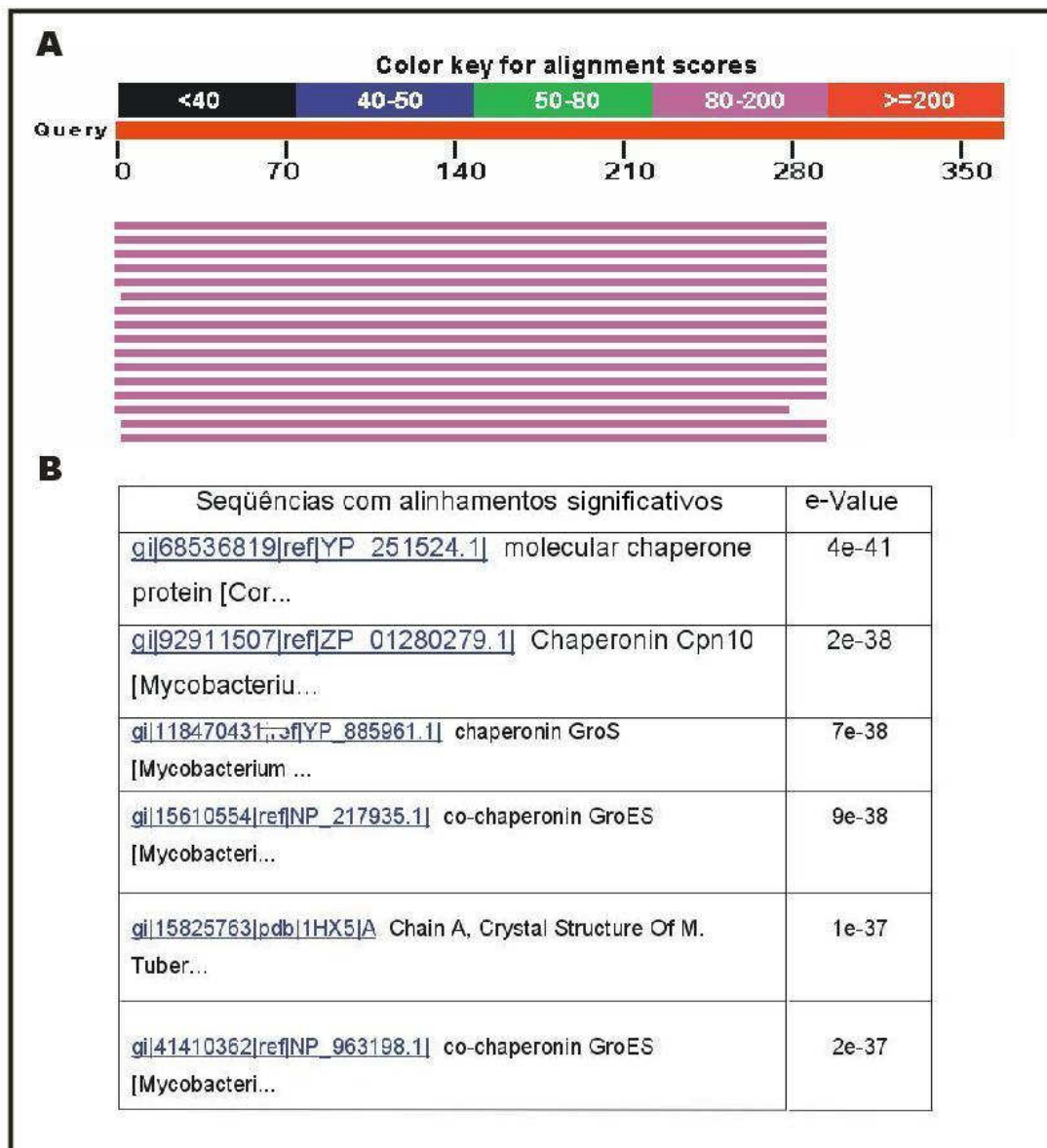


Figura 18: Resultado dos alinhamentos de maior similaridade em forma de gráfico(A) e tabelas com as suas informações respectivas geradas automaticamente pelo BLASTx(B).

As análises *in silico* ainda demonstram que a seqüência de aminoácidos da Hsp10 de *C. pseudotuberculosis* é mais conservada que a de nucleotídeos entre as corinebactérias. O mesmo foi verificado ao analisar a Hsp60, sendo que a explicação é a mesma.

Sendo transcritos a partir de um operon bicistrônico, sugere-se uma função comum para estes genes. Isto é esperado já que as duas proteínas agem em associação. A Hsp60 é composta por um complexo homo-oligomérico e consiste de 2 anéis heptaméricos formados por subunidades de 57 kDa. A atividade de chaperone *in vivo* requer a ação conjunta da co-chaperonina, a Hsp10. Esta forma um único anel homo-oligomérico composto de 7 subunidades de aproximadamente 10 kDa (Braig, 1998). Contudo, a cópia 2 nos actinomicetos se encontra organizada em um operon monocistronico e, em alguns casos, sua expressão é maior que a da cópia 1 (de Leo *et al.*, 1997). Provavelmente, a cópia 2 age independentemente da co-chaperonina (Ventura *et al.*, 2004).

4.2. PARTE 2

Desenvolvimento de uma vacina de subunidade protéica

4.2.1. Clonagem do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* no vetor de expressão procarioto (pProEx-Hta)

4.2.1.1. Clonagem do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* no vetor pTOPO:Blunt

O primeiro passo para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade protéica foi a clonagem da seqüência codificadora do gene *hsp60* em um vetor de expressão procarioto. Para alcançar este objetivo, primeiramente o gene em questão foi amplificado a partir do DNA genômico da linhagem virulenta T1. A análise em gel de agarose demonstrou a amplificação de um fragmento com o peso de aproximadamente 1637 pb (Fig. 19). O fragmento desejado foi então purificado a partir do gel de agarose e clonado no vetor pTOPO:Blunt. Esta amostra foi então utilizada para transformar *E. coli* TOP10. A partir do plaqueamento da cultura transformada, foram obtidos clones brancos; os quais tiveram o DNA plasmidiano isolado para a análise da presença do inserto e do peso molecular desejado.

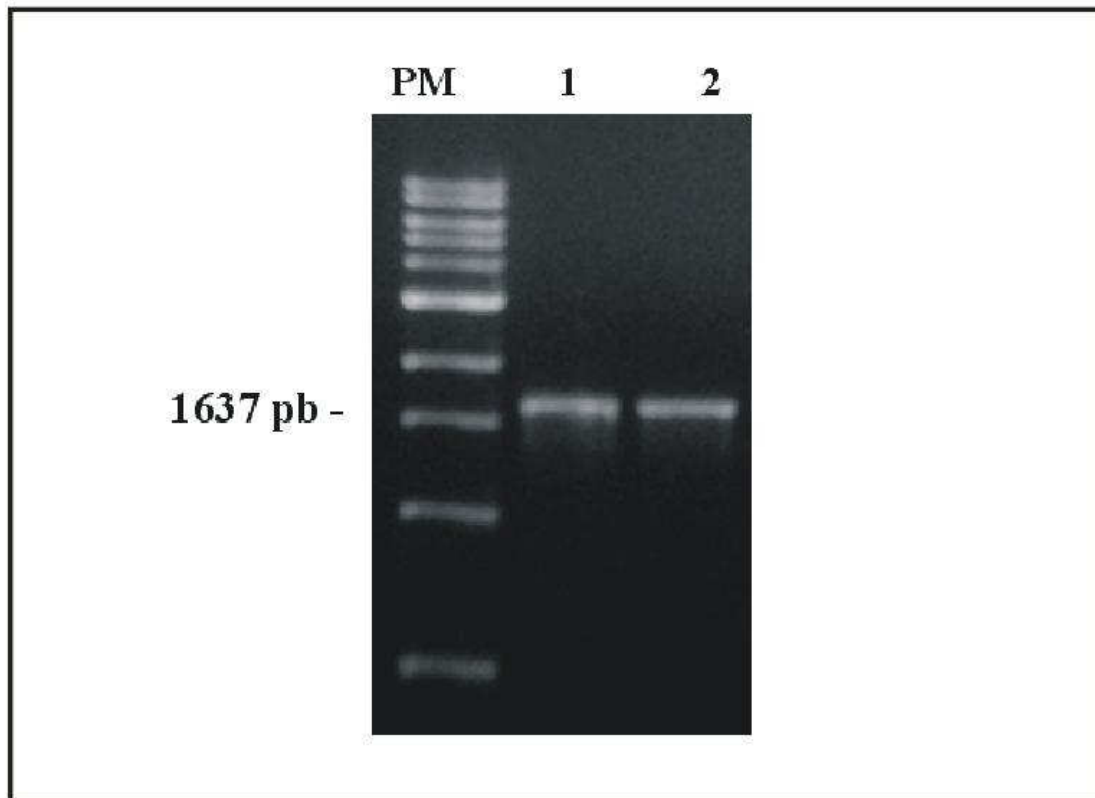


Figura 19: Amplificação do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* utilizando os iniciadores com os sítios de restrição para posterior clonagem direcional no vetor de expressão procarioto pProEx-Hta. Gel de agarose a 1% mostrando o produto da reação de amplificação, a qual teve como molde o vetor pTOPO:*hsp60*. PM: Padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 1 e 2: amplificação do gene *hsp60*.

4.2.1.2. Sub-clonagem do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* no vetor de expressão procarioto (pProEx-Hta)

O passo seguinte à clonagem de *hsp60* no vetor pTOPO:Blunt consistiu na transferência do fragmento de DNA referente ao gene *hsp60* para o vetor pProEx-Hta (Fig. 20). Os vetores pProEx-Hta e pTOPO:*hsp60p* foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e fracionados em gel de agarose a 1%. As bandas correspondentes a *hsp60* e a forma linear do pProEx-

Hta foram excisadas do gel e os fragmentos de DNA correspondentes foram purificados. As amostras foram então ligadas e usadas para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10. Foram obtidas colônias brancas, as quais foram testadas quanto à presença do inserto por PCR e digestão enzimática. Destas, algumas amostras foram seqüenciadas. Não houve alterações de bases (dados não apresentados). Sendo assim, um destes clones foi escolhido aleatoriamente para ser utilizado nos experimentos subsequentes.

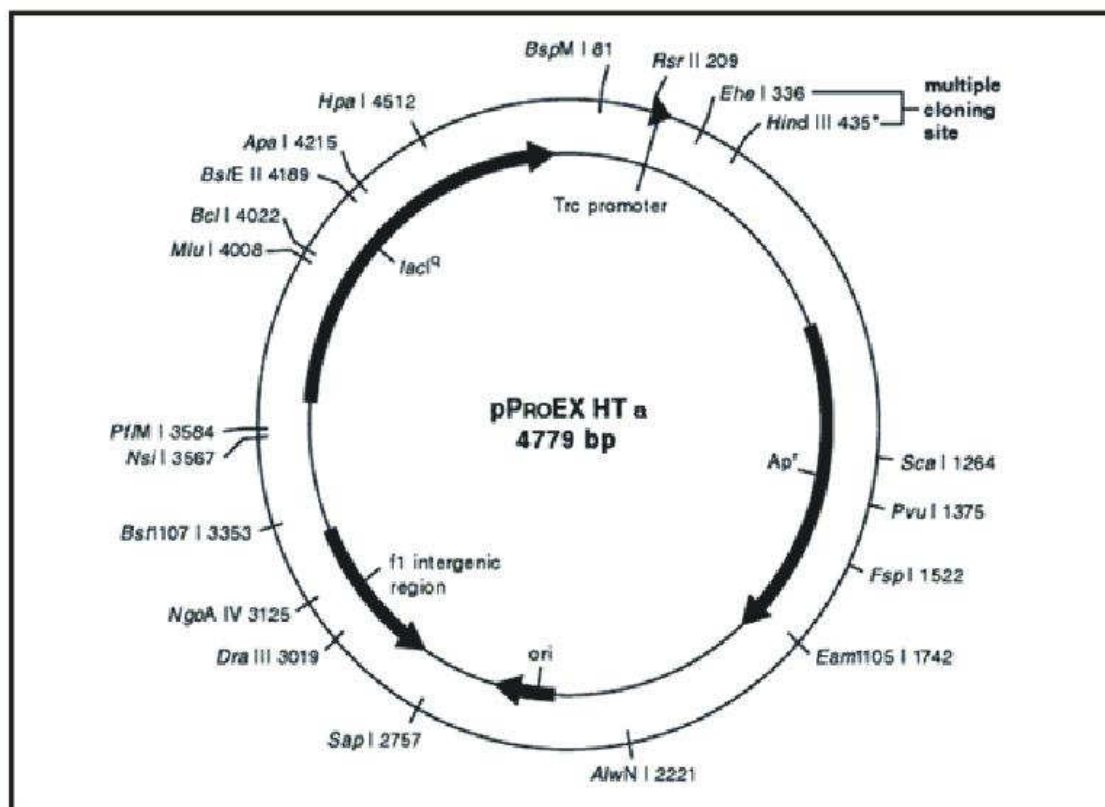


Figura 20: Mapa do vetor pProEx-Hta. O vetor contém os elementos genéticos necessários para a expressão em procariontes, como o forte promotor híbrido *trc* (-35 do triptofano e -10 da lactose), o qual está sob a regulação da proteína codificada pelo gene *lacI^q*. O promotor deste gene possui uma mutação que permite maiores níveis de expressão do gene *lacI^q*. O vetor contém a origem de replicação PBR322 e a seleção baseada na resistência ao antibiótico ampicilina. Além disso, possui uma cauda de 6 histidinas, na porção 5' do sítio múltiplo de clonagem. Esta tem por finalidade facilitar a purificação de proteínas recombinantes.

4.2.2. Expressão e purificação da proteína Hsp60 recombinante

4.2.2.1. Expressão piloto da proteína recombinante Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*

Para verificar a expressão da proteína recombinante Hsp60 em relação ao tempo após a indução, inicialmente foi realizada uma cinética de expressão. Culturas induzidas e não induzidas foram analisadas em gel de poli-acrilamida após 4 horas de indução. Uma banda apresentando o peso molecular esperado de 57 kDa para a proteína recombinante Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* foi visualizada nas amostras originadas da cultura induzida (Fig. 21). Apesar de os níveis de proteína obtidos em comparação com o tempo decorrido, após a indução da expressão protéica, não demonstrarem alterações significativas, o maior nível de expressão foi obtido após 4 horas de indução. Este foi então o tempo de indução escolhido para os experimentos posteriores.

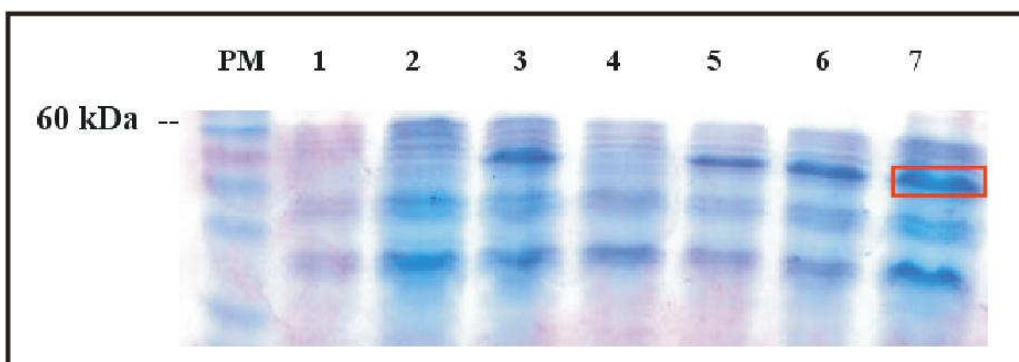


Figura 21: Cinética da expressão da proteína recombinante utilizando 0,6 mM de IPTG. As amostras foram analisadas em gel de poli-acrilamida 12% sob condições desnaturantes PM: marcador de peso molecular (Invitrogen); Canaleta 1: cultura não-induzida no momento da divisão da cultura em induzida e não induzida; Canaleta 2: cultura induzida no momento da divisão da cultura em induzida e não induzida, correspondente ao momento de adição do IPTG; Canaleta 3: cultura induzida 1 hora após a adição de IPTG; Canaleta 4: cultura não induzida uma hora após a sub-divisão da cultura; Canaletas 5, 6 e 7: cultura induzida 2, 3 e 4 horas após a adição de IPTG, respectivamente.

Na tentativa de melhorar os níveis de expressão após a indução, utilizou-se o mesmo procedimento adotado anteriormente para a expressão da proteína recombinante. A única modificação foi a adição de 1mM de IPTG para a indução da expressão protéica. As culturas induzida e não induzida foram analisadas após 4 horas de adição do indutor. Visualmente, os níveis de expressão foram maiores se comparados aos obtidos após a indução com 0,6 mM de IPTG (Fig. 22).

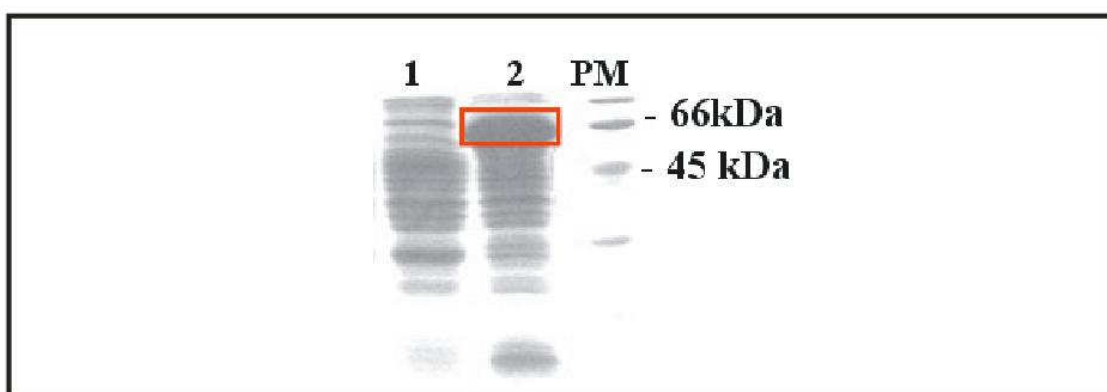


Figura 22: Expressão da proteína recombinante após a indução com 1 mM de IPTG. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes a produção de Hsp60 com 1mM de IPTG. Canaleta 1: cultura não induzida; Canaleta 2: cultura induzida; PM: padrão de peso molecular (Armesham).

4.2.2.2. Expressão da proteína recombinante Hsp60 em maior escala

A cultura induzida com 1 mM de IPTG durante 4 horas foi centrifugada e o precipitado foi ressuscitado em condições não desnaturantes. Para verificar se a proteína recombinante estava solúvel ou insolúvel, as células foram lisadas e as frações solúvel e insolúvel analisadas em gel de poliacrilamida. Verificou-se que a proteína recombinante, rHsp60, estava presente na fração insolúvel do lisado (Fig. 23). A formação de corpúsculos de inclusão quando as Hsp60 são super-expressas utilizando um sistema de expressão induzido por IPTG foi relatado por Wong e Lu (2004). Os autores sugerem que para obter a expressão destas

proteínas na forma solúvel pode-se utilizar estratégias como a redução da concentração do indutor IPTG. Contudo, a concentração de 1 mM foi a utilizada neste trabalho de dissertação para produzir a rHsp60 em quantidades satisfatórias, apesar das perdas na fração insolúvel. Segundo Carrio e Villaverde (2003), outra alternativa consiste em co-expressar Hsp60 e Hsp70, pois estas duas controlam de maneira antagonista a formação de corpúsculos de inclusão, promovendo e prevenindo, respectivamente, a agregação de proteínas no citoplasma.

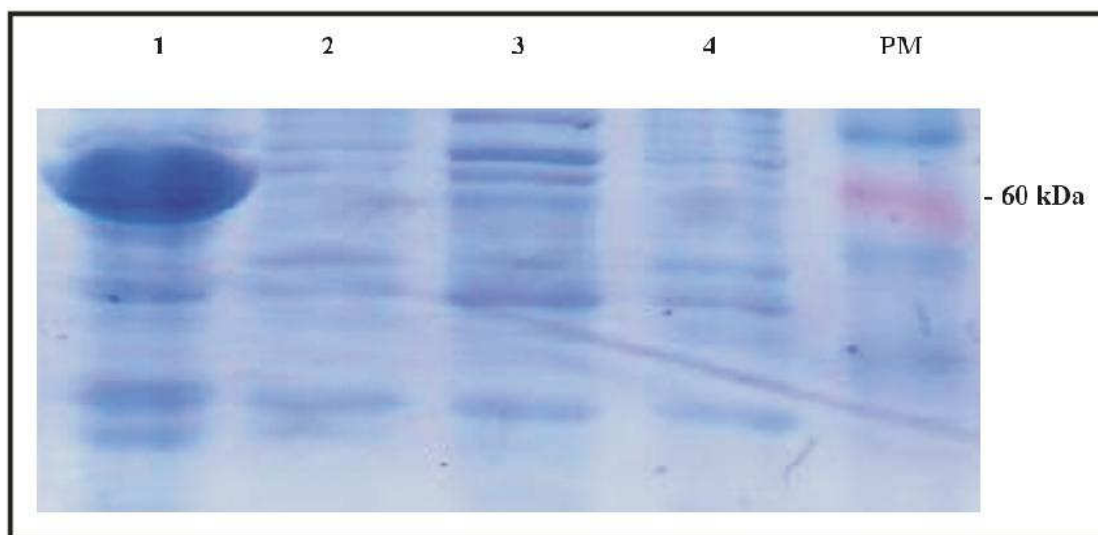


Figura 23: Análise das frações solúveis e insolúveis da cultura de 500 ml induzida com 1 mM de IPTG. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes. Canaleta 1: precipitado da cultura induzida; Canaleta 2: precipitado da cultura não-induzida; Canaleta 3: sobrenadante da cultura induzida; Canaleta 4: sobrenadante da cultura não induzida; PM: padrão de peso molecular (Invitrogen).

4.2.2.3. Purificação e diálise da proteína recombinante Hsp60

Para iniciar os processos de imunização e para a avaliação da resposta imunológica conferida pelo processo de imunização, necessitava-se obter a proteína recombinante em alta qualidade e em quantidade suficiente. Com este

intuito, iniciou-se o processo de purificação da rHsp60. Como esta se apresentava na fração insolúvel do lisado, a purificação foi realizada sob condições desnaturantes. O precipitado foi ressuspendido em Tampão Desnaturante contendo 8M de uréia, sendo que a concentração de proteínas foi dosada pelo método de Bradford. A amostra foi diluída para uma concentração final de 0,5 µg/µL e filtrada. A proteína recombinante foi então purificada por cromatografia líquida de afinidade a níquel em sistema HPLC Akta Explorer. Acompanhando a absorbância a 280 nm, observou-se um pico referente a 10 frações, sendo que cada fração era composta de 1 mL da amostra após o processo final da purificação. Este pico corresponde ao aumento abrupto na concentração de imidazol. As 10 frações foram analisadas quanto à presença da proteína recombinante em gel de poliacrilamida; as quatro primeiras frações continham proteína. Entretanto, somente as 3 primeiras foram utilizadas porque continham quantidades significantes.

A proteína recombinante foi então submetida à diálise, processo que permitiu que o tampão de eluição, no qual a proteína rHsp60 se encontrava diluída, fosse substituído gradativamente por PBS. Para evitar precipitação e a fim de proporcionar as condições adequadas para que a proteína readquirisse a conformação correta, foram utilizadas soluções gradativas de uréia. Ao final da diálise, não se observou sinais de precipitação protéica. Recuperou-se 1,6 µg/µL, sendo que em 3 mL obteve-se um rendimento final de 4,8 mg da rHsp60 purificada. Além disso, a amostra foi ainda analisada e confirmada

quanto à pureza da amostra em gel de poliacrilamida (Fig. 24).

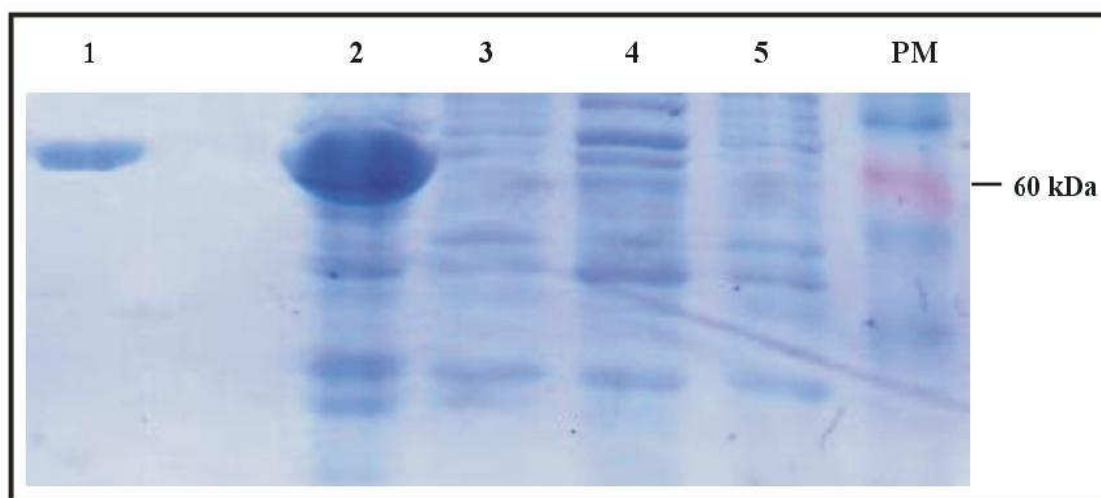


Figura 24: Comparação entre as frações solúveis e insolúveis da cultura de 500 ml induzida com 1 mM de IPTG antes e depois da purificação da proteína recombinante Hsp60. As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida 12% sob condições denaturantes. Canaleta 1: proteína purificada após a diálise; Canaleta 2: precipitado da cultura induzida; Canaleta 3: precipitado da cultura não-induzida; Canaleta 4: sobrenadante da cultura induzida; Canaleta 5: sobrenadante da cultura não induzida; PM: padrão de peso molecular (Invitrogen).

A eficiente purificação pode ser explicada pela presença de 2 caudas de histidina: a do vetor na porção N-terminal e a da própria proteína na C-terminal. Ojha *et al.* (2005) utilizaram com sucesso a afinidade de histidinas ao níquel para co-purificar a cópia 1 de Hsp60 de *M. smegatis* e outras proteínas complexadas a ela. Além disso, os autores demonstraram que a remoção de 18 resíduos da porção C-terminal da proteína elimina a purificação da cópia 1 de Hsp60.

4.2.3. Caracterização funcional da proteína Hsp60

Com a finalidade de caracterizar funcionalmente a proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*, adotou-se como estratégia o teste de complementação. Para isso, utilizou-se uma *E. coli* mutante (GroEL 44) que apresenta uma deleção do

gene *hsp60*. Mutantes *hsp60* de *E. coli* apresentam 2 fenótipos principais: termosensibilidade e a inability de manter o crescimento do fago λ . *E. coli* selvagem, B178, transformada com o plasmídeo pProEx-Hta e da mutante transformada com pProEx-Hta e com pProEx-Hta:*hsp60* foram testadas quanto a estes fenótipos (Fig. 25, 26 e 27).

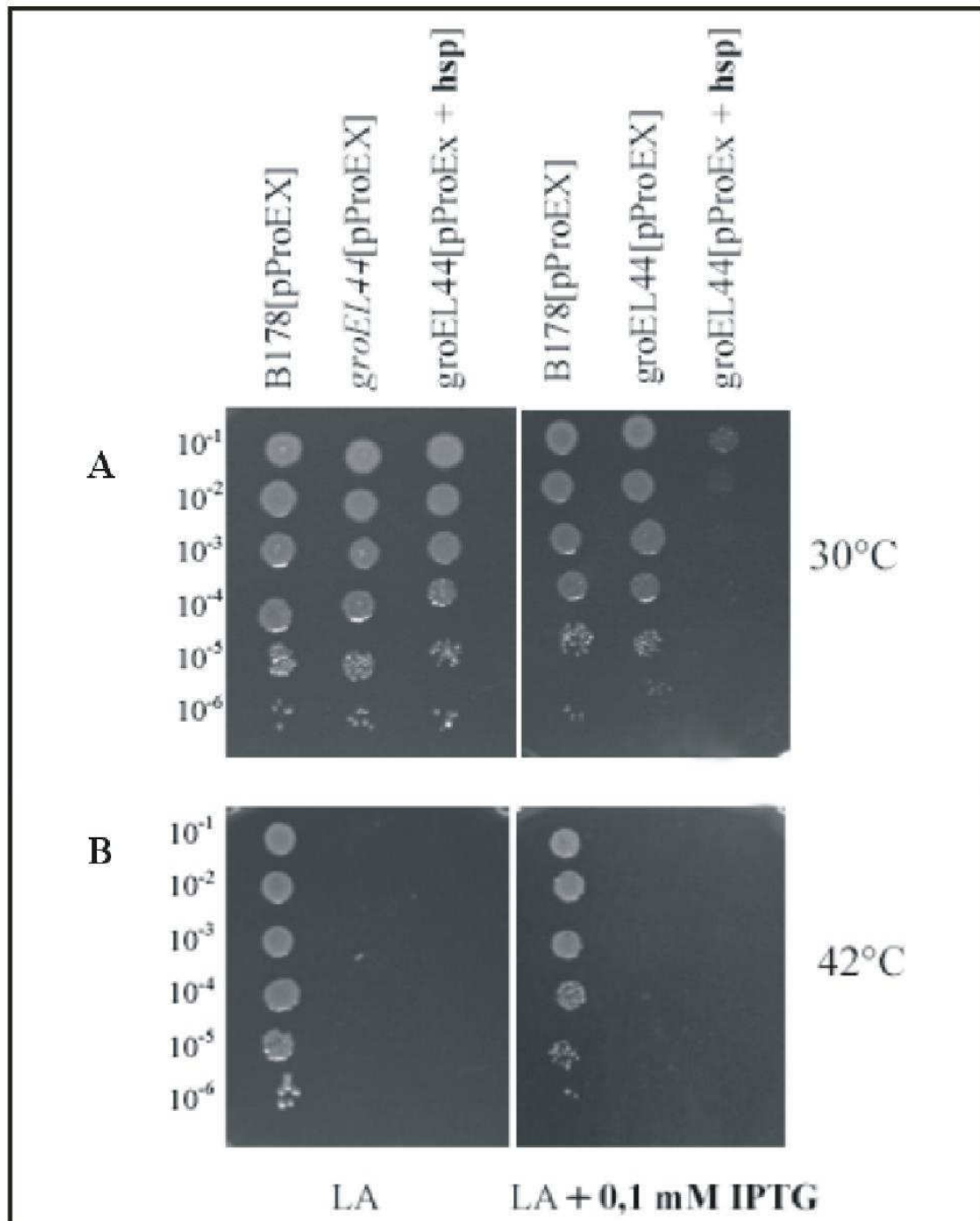


Figura 25: Teste de complementação gênica após estresse térmico. Foi analisado o crescimento bacteriano da linhagem de *E. coli* B178 selvagem, transformada com pProEx-Hta, e da linhagem Groel44 mutante, transformada com pProEx-Hta e/ou pProEx-Hta:*hsp60*. Culturas destas linhagens foram induzidas com 0,1 mM de IPTG e então plaqueadas nas diluições de 10^{-1} a 10^{-6} em ágar contendo ou não a presença deste indutor. As placas foram mantidas por 18 horas a (A) 30°C e a (B) 42°C.

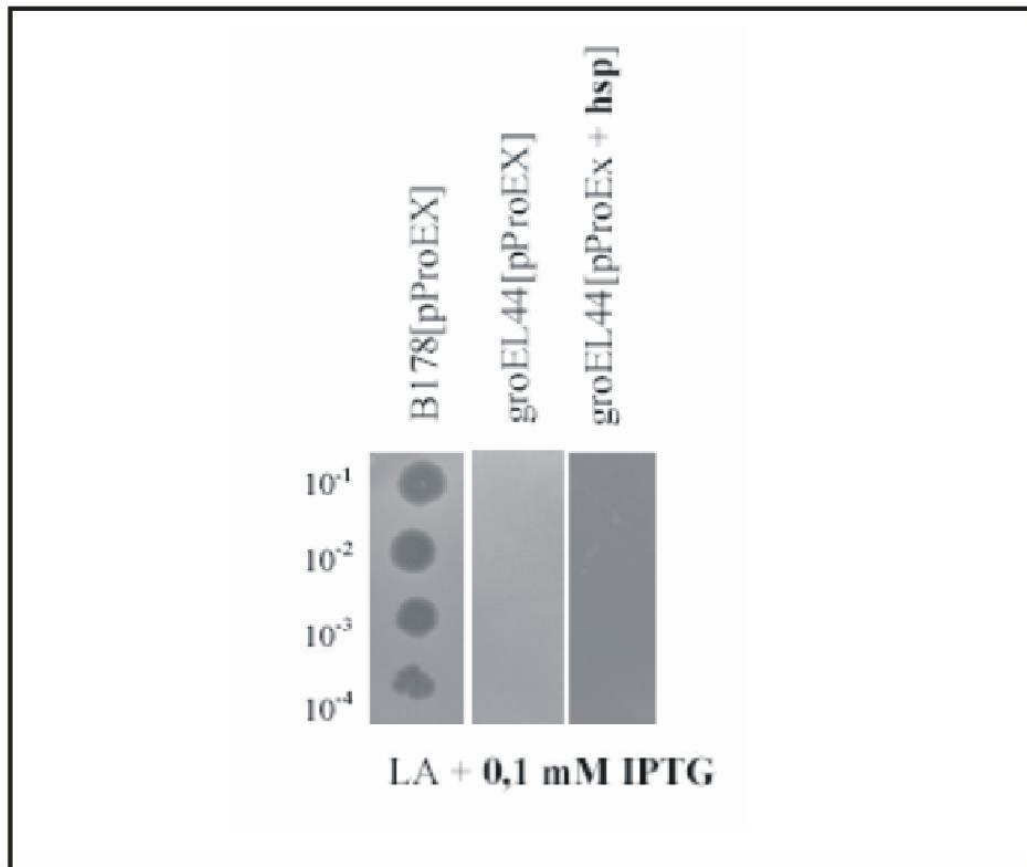


Figura 26: Teste de complementação utilizando como parâmetro o crescimento do fago λ clb2 em linhagens mutantes (groEL44) de *E. coli*. O crescimento do fago foi avaliado a partir das unidades formadoras de placas da linhagem de *E. coli* selvagem B178, transformada com pProEx-Hta, e da linhagem mutante para o gene *hsp60* groEL44, transformada com pProEx-Hta e/ou pProEx-Hta:*hsp60*. A linhagem selvagem é sensível ao fago e a mutante, é resistente. Diluições seriadas destas culturas foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina e com ou sem a adição de 0,1 mM IPTG. Estas placas foram então incubadas a 30° por 18 horas. transformada e da bactéria selvagem, a qual é sensível ao fago. O mesmo resultado foi obtido nas placas sem IPTG (dados não apresentados).

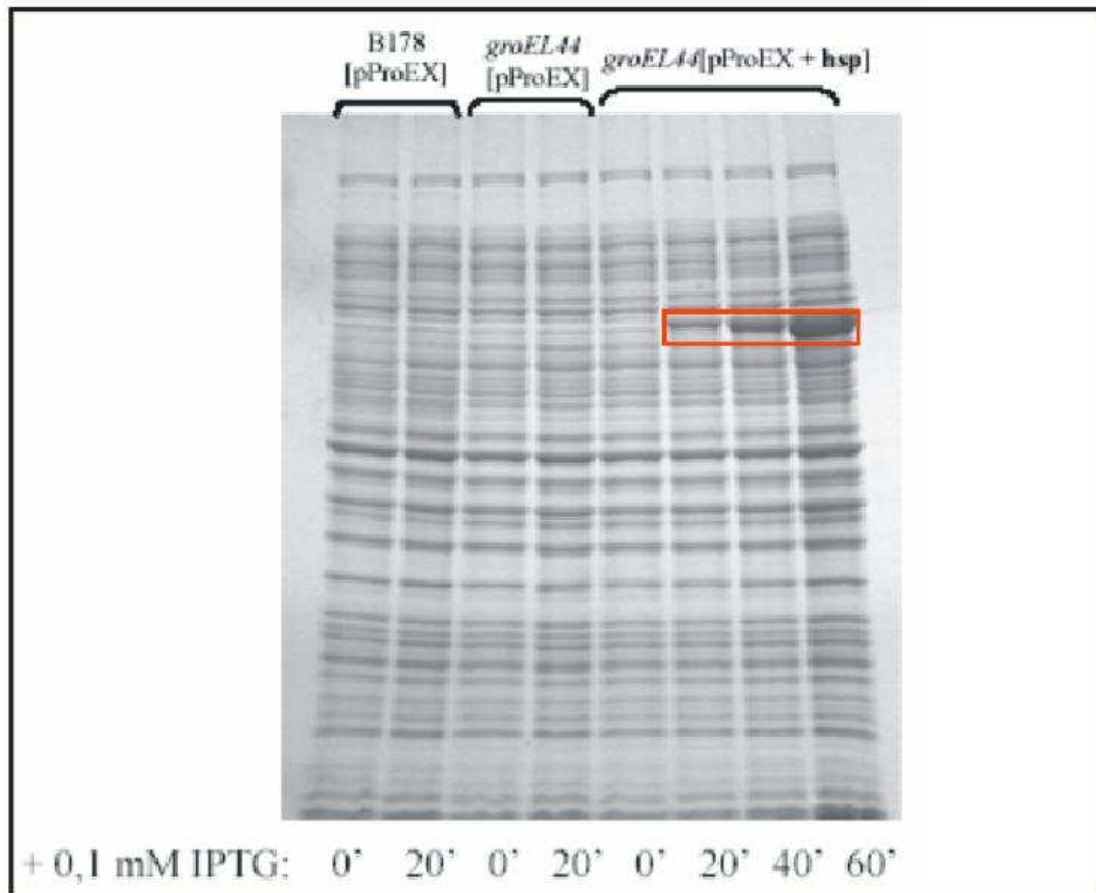


Figura 27: Expressão da proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* em linhagem mutante de *E. coli* para o gene *hsp60* (*groEL44*) transformada com o vetor pProEx:*hsp60*. A produção da proteína recombinante foi analisada após 20, 40 e 60 minutos após a indução da expressão com 0,1 mM de IPTG. A linhagem selvagem B178 e a linhagem mutante groEL44 de *E. coli* transformadas com o vetor pProEx-Hta foram utilizadas como controle negativo.

Após a exposição a uma temperatura de estresse térmico de 42°C, não se observou crescimento bacteriano. Por este experimento de termosensibilidade, a proteína Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* não foi capaz de restaurar o fenótipo selvagem da *E. coli* mutante. Os resultados ainda demonstram que, mesmo a 30°C, a mutante transformada com pProEx-Hta:*hsp60* somente cresceu na diluição de 10^{-1} quando a cultura foi plaqueada em meio ágar contendo IPTG. A falha em restaurar o fenótipo selvagem da linhagem mutante de *E. coli* poderia ser

uma consequência da ausência de expressão da proteína Hsp60. Contudo, o gel de SDS-PAGE demonstra que houve a expressão da proteína recombinante. A incapacidade de complementação foi ainda confirmada com o experimento com o fago, em que não se observou qualquer crescimento.

De acordo com Kim *et al.* (2001), os níveis de transcritos de Hsp60 após estresse térmico alcançam um máximo dentro de 7 a 10 minutos e depois decaem gradualmente. A expressão destas proteínas deve ser apenas transiente, mesmo após exposição por longos períodos a um estresse térmico, já que a presença de grandes quantidades desta proteína pode ser adversa à homeostase protéica e a algumas funções intracelulares (Pockley, 2001). Isto explicaria ausência de crescimento bacteriano a 30°C em ágar contendo IPTG .

Em relação à falha na complementação gênica pela Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*, há algumas hipóteses explicativas. Como a Hsp60 normalmente é requerida para a formação do capsídeo de fagos (Lee *et al.*, 1997) e não se observou o crescimento do fago, a Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* não está envolvida com uma função específica: a formação de capsídeos. No teste de termosensibilidade, de acordo com Kuchanny-Ardigò e Lipinska (2003), essas chaperoninas estão envolvidas em múltiplos processos e a presença de mínimas diferenças pode ter um efeito acumulativo que não permita a restauração do fenótipo selvagem sob condições de estresse térmico. Além disso, *E. coli* e *C. pseudotuberculosis* são bactérias filogeneticamente distantes e, segundo Eom *et al.* (2005), as Hsp60 são proteínas espécie-específicas.

Em relação ao grupo dos actinomicetos, a discussão de funcionalidade das chaperoninas da família Hsp60 não pode excluir o fato da existência de 2 seqüências codificadoras para Hsp60 no genoma. Apesar de pertencerem ao domínio estrutural, Radford (2006) relatou que alterações nos motivos GGM na região C-terminal da proteína para GGA ou AAA influenciam a ação da chaperonina. Isto pode ter influenciado a ação de chaperone da Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*, pois esta possui repetições de histidna que diferem dos motivos GGM. Além disso, a ação de chaperonina em *Corynebacterium* é descrita como uma das funções da cópia 2 da Hsp60. Segundo Barreiro et al (2005), se a cópia 1 tiver a função de chaperonina, ela ocorre somente com determinadas proteínas.

4.2.4. Avaliação do isótipo IgG anti-rHsp60 a partir de soro de caprinos infectados com a linhagem selvagem de *C. pseudotuberculosis*

A Hsp60 bacteriana é reconhecida pelas células do sistema imunológico e então induzem uma resposta imunológica mediada por anticorpos e por linfócitos T. Sendo assim, estas moléculas são consideradas imunogênicas. Diante deste fato, propôs-se a caracterização da resposta humoral de caprinos infectados com a linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* Pus6 contra a proteína Hsp60 desta espécie bacteriana. Com esta finalidade, o soro destes animais foi utilizado para caracterizar a produção do isótipo IgG anti-rHsp60 por meio do ensaio imunoenzimático do tipo indireto.

Os resultados demonstram que há anticorpos que reagem com rHsp60 desde o primeiro dia de infecção e que não houve mudança significativa do perfil de resposta humoral durante 76 dias após a imunização. Este fato foi observado nos dois grupos, os quais foram infectados com doses diferentes (Fig. 28).

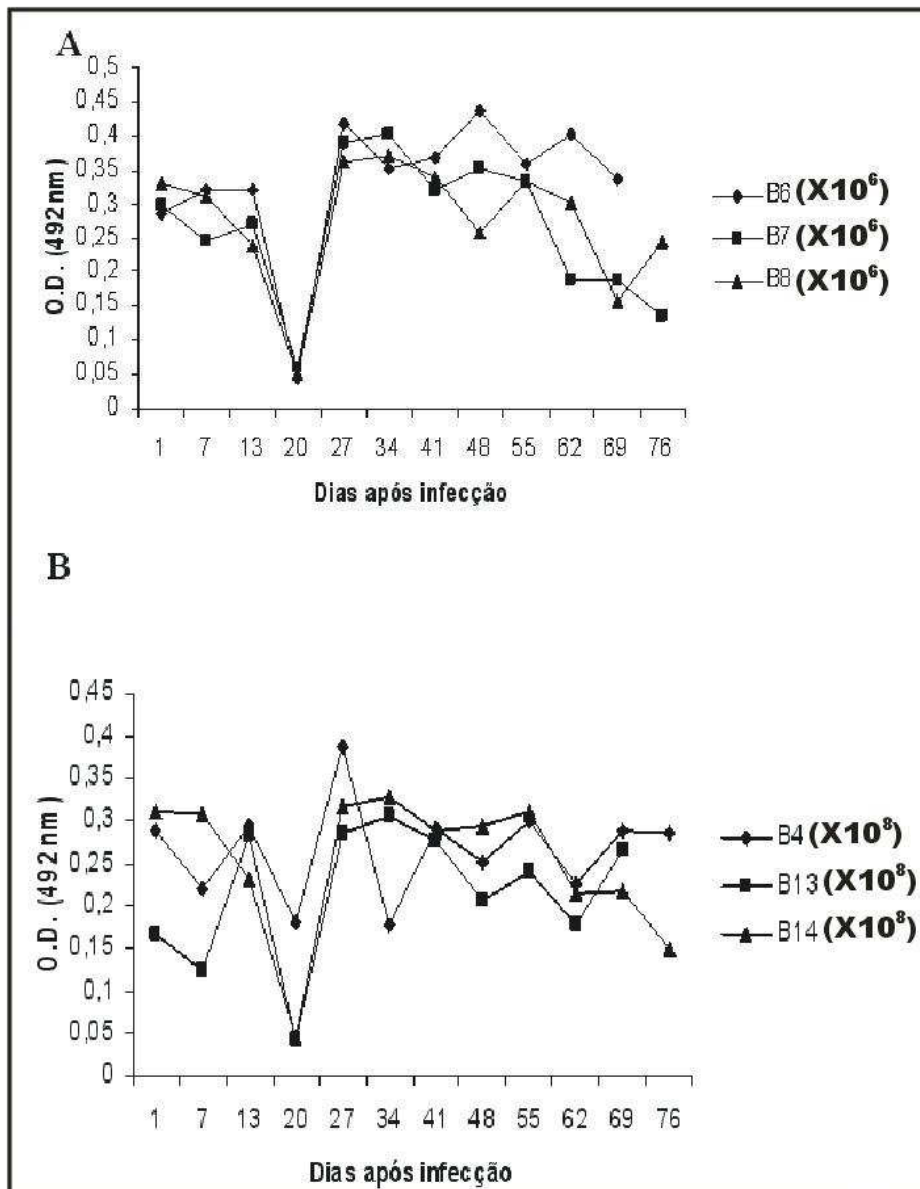


Figura 28: (A) Produção do isótipo IgG em caprinos infectados com 10⁶ UFC de uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*; e (B) Produção do isótipo IgG em caprinos infectados com 10⁸ UFC de uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*. Durante 76 dias, o soro dos animais foi coletado a cada semana e analisado por ensaio imunoenzimático. A produção do isótipo IgG é observado no dia 1 da infecção, sendo que os níveis de anticorpos não aumentam de forma significativa durante os 76 dias de infecção. Os animais foram denominados com a letra B e com uma respectiva numeração. Entre parêntesis (10⁶ e 10⁸), está a UFC correspondente às utilizadas na imunização.

Os resultados podem sugerir que a Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* não é imunogênica. Contudo, isto não pode ser afirmado sem analisar outros fatores

relacionados à geração da resposta imunológica. A avaliação da resposta celular contra esta proteína nestes animais contribuiria para a caracterização da imunogenicidade da Hsp60.

De acordo com Zügel e Kaufmann (1999), o impacto que as Hsps exercem na sobrevivência dos microrganismos em seus respectivos hospedeiros varia conforme os mecanismos de infecção. De acordo com os autores, a habilidade dos microrganismos de sobreviver em macrófagos mesmo sem o aumento dos níveis de expressão das Hsps pode ser explicada pela habilidade do patógeno em evadir o ambiente endossômico nos estágios iniciais da fagocitose. Isto também pode ser aplicado à *C. pseudotuberculosis*. Esta bactéria é resistente à fagocitose, tanto pela barreira física da camada lipídica (Alves *et al.*, 1997) como pela incapacidade de produção de óxido nítrico por macrófagos infectados (Bogdan *et al.*, 1997). Aliada a esta explicação, por terem localização preferencialmente citoplasmática, estas proteínas podem não ser acessíveis à apresentação eficiente ao sistema imunológico.

A presença de anticorpos que reagem contra a Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* a partir do primeiro dia de infecção sugere que os animais possam ser infectados e assintomáticos ou já terem tido contato com a bactéria. Além disso, esta resposta humoral pode se dever a anticorpos naturais que apresentam resposta cruzada à proteína Hsp60 da bactéria em questão (Prohászka e Füst, 2004).

4.2.5. Avaliação da resposta imunológica conferida pela imunização com rHsp60

As Hsp60 bacterianas ou de mamíferos sinalizam perigo ao sistema imune inato. Elas são reconhecidas por células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (Pockley, 2001). Este reconhecimento envolve receptores, tais como os “Toll Like” (TLRs) (Prohászka e Füst, 2004). Estes, ao reconhecerem seus ligantes, induzem a expressão de uma variedade de genes do hospedeiro relacionados com a defesa contra patógenos, como a expressão de citocinas e quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, moléculas co-estimulatórias e MHCs. As citocinas produzidas incluem TNF- α e INF- γ (Moseley, 2000), as quais são necessárias para o desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra a infecção por *C. pseudotuberculosis*.

As Hsps, por sinalizarem situações de estresse, são encontradas na superfície celular e seus epitopos são apresentados via MHC I em células infectadas. Esta exposição permite o reconhecimento pelo sistema imune adaptativo, gerando uma resposta por células CD8+ (van Eden *et al.*, 2005). Os efeitos inflamatórios desencadeados pelo reconhecimento das Hsp têm sido associados a seqüências específicas e não conservadas.

A resposta imunológica gerada contra epitopos específicos sugere o uso potencial destas proteínas em testes vacinais. Além de serem antígenos imunodominantes em infecções bacterianas (van Eden *et al.*, 2005), relatou-se que a imunização experimental com a Hsp60 estimulou resposta celular protetora

contra bactérias intracelulares facultativas, como *Yersinia enterocolitica* (Noll e Autenrieth, 1996), por exemplo.

Afim de avaliar a proteção conferida pela imunização com Hsp60 recombinante de *C. pseudotuberculosis*, camundongos BALB/c foram imunizados com 3 doses de 25 µg associada ao adjuvante de Freund por via subcutânea. As repostas humoral e celular, induzidas pela imunização, foram avaliadas.

4.2.5.1. Avaliação do perfil de resposta humoral induzida pela imunização com rHsp60

O nível de produção de anticorpos do isótipo IgG anti-rHsp60 nos animais imunizados com a proteína recombinante foi avaliado através do ensaio imunoenzimático do tipo indireto. Além de IgG, a produção de seus subtipos IgG2a e IgG1 também foi avaliada.

A produção de IgG e IgG2a anti-Hsp60 pelos animais imunizados com a proteína recombinante Hsp60 foi estatisticamente significativa nos 3 tempos de coleta em relação ao grupo controle, o qual foi imunizado com PBS (Fig. 29A e 29C, respectivamente). No caso de IgG1, a resposta foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle somente após a segunda coleta. (Fig. 29B). A partir deste resultado, pode-se afirmar que a imunização com a proteína recombinante estimula a produção de anticorpos específicos contra a mesma. Além disso, a proteína induz tanto a produção de anticorpos neutralizantes (IgG1) como opsoninas (IgG2a). A produção de opsoninas anti-Hsp60 é a principal via

reguladora da ativação do complemento por estas proteínas (Proháska e Füst, 2004). Resultado semelhante foi obtido após a imunização de BALB/c com a Hsp60 recombinante de *R. equi*, microorganismo relacionado filogeneticamente à *C. pseudotuberculosis* (Vanniasinkam *et al.*, 2004).

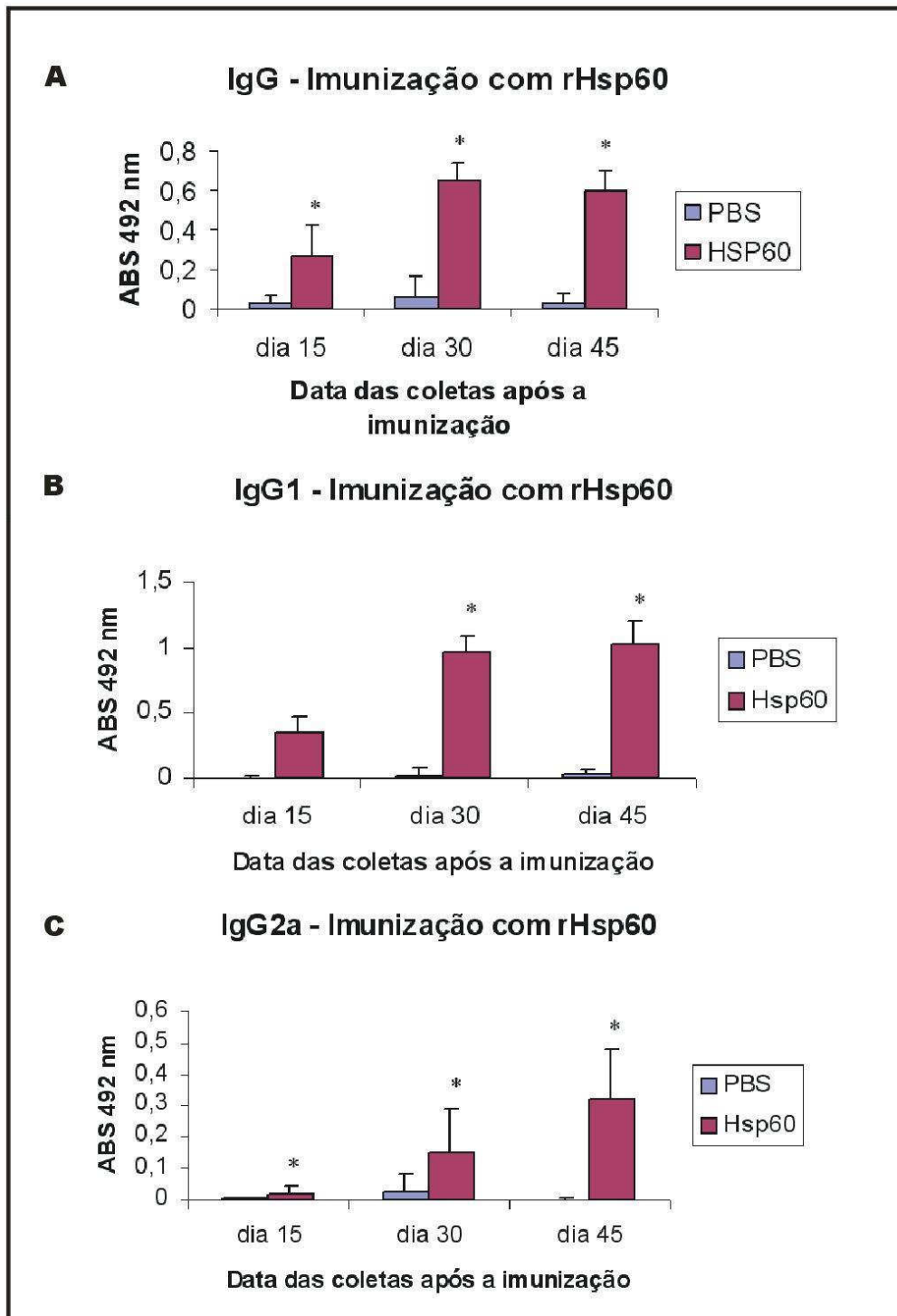


Figura 29: Níveis de produção de (A) IgG, (B) IgG1 e (C) IgG2a anti-HSP60 pelos camundongos imunizados com a proteína recombinante Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* associada ao adjuvante de Freund. O soro de 5 camundongos BALB/c foram coletados com 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização dos animais com 25 µg por via sub-cutânea. Diferenças estatisticamente significativas, utilizando o teste "t" de student não pareado ($P < 0,05$), em relação aos controles estão representadas por um asterisco *.

4.2.5.2. Avaliação da resposta celular

Para melhor avaliar a resposta imune celular, foi realizada a detecção das citocinas INF- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 “*in vitro*” pela estimulação de esplenócitos extraídos de camundongos imunizados com Hsp60. INF- γ e IL-4 são citocinas secretadas por linfócitos T auxiliares diferenciados para o perfil Th1 ou Th2, respectivamente. TNF- α e IL-10 podem ser produzidas em ambos os tipos de resposta, sendo que somente a produção unicamente de citocinas reguladoras, como IL-10, indica a diferenciação para um perfil regulador.

Para discernir entre a produção das diferentes citocinas por clones de células brancas estimuladas e diferenciadas pela imunização com Hsp60, a cultura de esplenócitos pré-sensibilizados foi re-estimulada com diferentes antígenos, assim como descrito nos “Materiais e Métodos” deste manuscrito de dissertação. As estimuladas com meio constituem o controle negativo; as estimuladas com a proteína recombinante purificada são as amostras relacionadas ao perfil de resposta celular induzido pela imunização com rHsp60. Além disso, as culturas foram estimuladas com 2 controles positivos: Concavalina-A, um mitógeno inespecífico de linfócitos, e lipopolissacarídeo (LPS). Como a purificação de proteínas expressas em bactérias gram-negativas apresentam contaminação com LPS, o resultado obtido em relação às células estimuladas com a proteína recombinante deve ser comparado com as estimuladas com o LPS. A Hsp60 recombinante foi expressa em *E. coli* e utilizada tanto na imunização dos animais como na estimulação dos esplenócitos na cultura celular.

Para diferenciar se a resposta celular obtida após a imunização se deve a estimulação antígeno-específico ou devido à presença de contaminantes, como as endotoxinas, um outro controle foi utilizado nas culturas. A polimixina é um antimicrobiano que se liga à porção lipídica A dos lipopolissacarídeos. Esta ligação resulta em uma completa neutralização da atividade da endotoxina. Por estas características, este produto foi adicionado à cultura.

A produção de INF- γ e de IL-10 a partir de culturas com a adição de polimixina são apresentados na figura 30A e 30B, respectivamente. Pelos gráficos, observa-se que a produção de INF- γ pelas células estimuladas com rHsp60 é devida à contaminação por LPS. Em relação à produção de IL-10, observou-se que os níveis desta citocina a partir de células estimuladas com rHsp60 foram significativos em relação às células estimuladas com LPS. Quanto a IL-4 e TNF- α , não houve produção destas citocinas. A produção de IL-10 sugere um perfil imunomodulatório. A imunomodulação por IL-10 pode até mesmo ter inibido a produção de INF- γ .

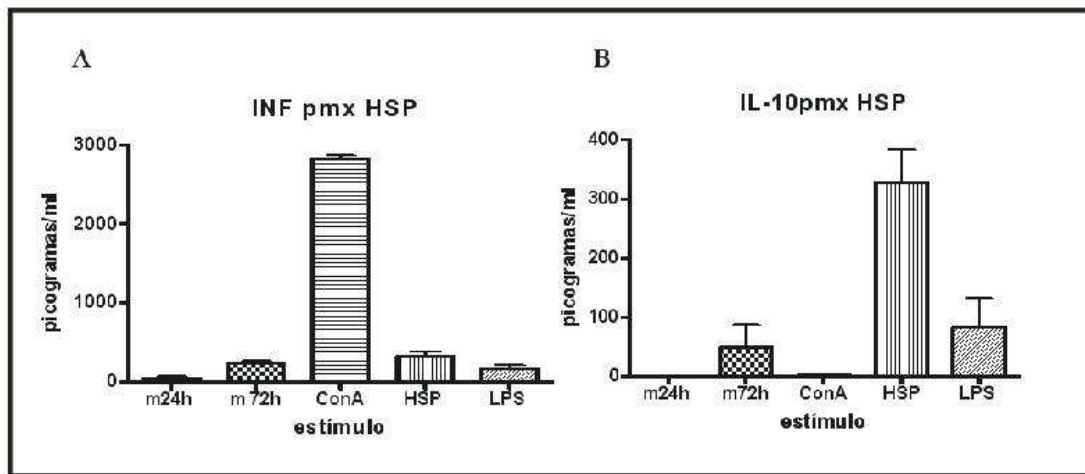


Figura 30: Perfil de citocinas dos camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante Hsp60 de *C. pseudotuberculosis* associada ao adjuvante de Freund. Foram administradas 3 doses consistindo de 25 µg/animal a um grupo de 5 animais. Sete dias após a terceira imunização, estes animais foram sacrificados e o baço macerado para que suas células fossem cultivadas. Diferentes antígenos foram adicionados à cultura celular: meio RPMI 1640; 1 µg/poço de concanavalina A; 50 µg/ml de rHsp60 e 2,5 ng/ml de LPS (quantidade presente em 50 µg/ml de proteína). pmx: polimixina; m24: cultura estimulada com meio RPMI após 24h de cultura; m72: cultura estimulada com meio RPMI após 72h de cultura; ConA: cultura estimulada com concanavalina A; HSP: cultura estimulada com rHsp60 de *C. pseudotuberculosis*; LPS: cultura estimulada com LPS.

As Hsps são proteínas imunomodulatórias que podem agir de duas formas. Além dos epitopos que geram uma resposta inflamatória, o sistema imunológico também reconhece seqüências conservadas entre as Hsps de procaríotos e eucariotos, gerando uma resposta cruzada e imunossupressora (Mustafa, 2002), com produção de IL-10 (van Eden *et al.*, 2003).

Se as células T geraram uma resposta imunológica contra epitopos conservados, os fatos acima expostos justificariam os resultados obtidos após a imunização dos camundongos com a rHsp60 de *C. pseudotuberculosis*. A conservação entre a Hsp60 desta bactéria com a de diferentes microorganismos,

tanto procariotos como eucariotos, foi aqui predita na análise de domínios. Esta observação sugere a presença de epitopos imunossupressores, os quais poderiam ativar células produtoras de IL-10. Esta foi observada após a terceira imunização com rHsp60 de *C. pseudotuberculosis*; resultado semelhante foi obtido com a Hsp60 de micobactérias (van Eden *et al.*, 2005). A produção de IL-10 pode ser uma resposta imunoreguladora contra a geração de respostas auto-imunes.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que inibe a expressão de outras citocinas inflamatórias, como o INF- γ . Isto justifica o resultado obtido após a imunização com rHsp60. Em relação à *C. pseudotuberculosis*, a alta produção de IL-10 pela Hsp60 exerceria um interessante mecanismo de evasão do sistema imunológico. Ao observar a interação parasita-hospedeiro, a situação de estresse induziria um aumento de expressão de IL-10. Esta, por inibir a produção de outras citocinas como INF- γ , impediria a eliminação da bactéria pelo sistema imunológico, já que a resolução da infecção é dependente dos efeitos desta citocina nas células do sistema imunológico. Contudo, o perfil de citocina deve ser melhor analisado durante as imunizações para confirmar se somente esta citocina é produzida.

Altos níveis de IL-10 e ausência de outras citocinas sugere uma resposta reguladora. Contudo, os resultados devem ser analisados com cautela. Para afirmar se a resposta é reguladora, deve-se analisar a produção de outra citocina referente a este perfil: a TGF- β . Aliado a isso, o perfil de citocinas foi observado somente após a terceira imunização. Não se pode excluir a possibilidade de a

imunização com rHsp60 ter gerado uma resposta inflamatória intensa, a qual foi então regulada pelo organismo pela produção de IL-10.

As propriedades estimulatórias e reguladoras das proteínas de choque térmico de procariotos foram sugeridas por van Eden *et al.* (2003) e por Zanin-Zhorov *et al.* (2005a) e parece envolver fatores inter-relacionados, como as interações destas proteínas com TLRs, o aumento do nível de expressão destas proteínas em resposta ao estresse celular, e pela sua conservação molecular entre procariotos e eucariotos (van Eden *et al.*, 2005).

Durante a migração aos sítios inflamatórios, as células T encontram diversas moléculas imunomodulatórias, como a Hsp60 do hospedeiro. Esta proteína diminui o rearranjo do citoesqueleto e da quimiostase, o que se deve à super-regulação de uma proteína supressora da sinalização de citocinas via TLR2 (Zanin-Zhorov *et al.*, 2005a). Células T humanas ativadas na presença de Hsp60 alteram o perfil de citocinas de Th1 por INF- γ , para Th2 com marcada produção de IL-10 (Zanin-Zhorov *et al.*, 2005b). Isto confirma a hipótese da ação da proteína supressora de citocinas, a qual regula e mantém respostas Th2.

A ação inflamatória e reguladora também pode ser explicada pelo reconhecimento destas proteínas pelos TLRs. A resposta supressora é dependente da dose (de 0.1-1 ng/ml e maiores que 1 μ g/ml) e do tempo de exposição a estas proteínas (a partir de 18 horas), o que sugere que Hsp60 é reconhecida por diferentes receptores de baixa ou alta afinidade. Esta regulação parece ser necessária pra manter a homeostase celular no sítio da inflamação, definindo a intensidade e a duração da mesma (Zanin-Zhorov *et al.*, 2005a).

A ação reguladora das Hsps do hospedeiro também é exercida após a exposição do sistema imunológico às Hsps bacterianas. Hsp60 de bactérias e o processo inflamatório induzido pela imunização induzem o aumento dos níveis de expressão das proteínas do choque térmico do hospedeiro. A alta expressão das últimas gera uma resposta imunorreguladora, já que há células T que as reconhecem e que secretam citocinas imunoreguladoras, como a IL-10. Estas células seriam então recrutadas ao sítio de inflamação onde elas regulariam os clones de células T patogênicas (Quintana e Cohen, 2005).

A presença destas células T reguladoras pode resultar da exposição destes clones ao ambiente altamente tolerogênico da mucosa intestinal. A tolerância local e sistêmica pode ser induzida após a exposição de proteínas do choque térmico de microorganismos ou das células T que reconhecem as próprias proteínas do hospedeiro, considerando a alta homologia destas proteínas entre procariotos e de eucariotos (van Eden *et al.*, 2003).

Situações de estresse celular também induzem maiores níveis de expressão nas APCs não-profissionais. Ao apresentar suas próprias proteínas do choque térmico ao sistema imunológico na ausência de moléculas co-estimulatórias, resultaria em anergia clonal (células não responsivas). Estas células podem exercer funções regulatórias, seja pela produção de IL-10 ou pela indução de APCs imunomodulatórias (van Eden *et al.*, 2005). Além disso, por serem moléculas sinalizadoras de estresse celular, as Hsps podem servir como marcadores celulares, sendo reconhecidas por células T reguladoras que

controlam a habilidade de células T de induzir respostas auto-imunes (Quintana e Cohen, 2005).

O tipo de resposta imunológica gerada depende da natureza do estímulo. Qualquer fator que interfira no reconhecimento da Hsp60 pode alterar o perfil imunológico (van Eden *et al.*, 2005). O uso de adjuvantes como a IL-12 e o completo de Freund, que induzem uma forte resposta do tipo Th1 (Jones *et al.*, 2001), aumentou a eficiência das proteínas Hsp60 e Hsp65 de *Yersinia enterocolitica* e *M. leprae*, respectivamente, na vacinação contra bactérias intracelulares (Noll e Autenrieth, 1996; Bonato *et al.*, 1998). Contudo, este tipo de resposta não foi observado após a terceira imunização com a rHsp60 de *C. pseudotuberculosis*. Apesar disso, não é possível estabelecer maior precisão nesta comparação, já que diferentes adjuvantes foram utilizados com este propósito (Tabela 8).

Uma marcante resposta humoral, como a obtida após a imunização com rHsp60, pode ainda influenciar a resposta imunológica gerada com a imunização. Anticorpos podem neutralizar a ação estimulatória das Hsps, impedindo o reconhecimento destas pelo sistema imune inato. Conseqüentemente, a Hsp60 não se ligaria aos TLRs e então não haveria a superestimulação destes com a conseqüente produção de respostas de perfil Th1 (Prohászka e Füst, 2004). Além disso, os anticorpos neutralizantes podem induzir uma resposta por IL-10. Estas hipóteses explicariam os resultados obtidos após a imunização com rHsp60.

4.2.5.3. Avaliação da proteção dos animais imunizados com rHsp60

Assim como descrito na seção de Matérias e Métodos, 21 dias após a terceira imunização, os animais foram desafiados com uma dose sub-letal de 10^6 UFC de uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis* Pus6. A proteção foi avaliada de acordo com a taxa de sobrevivência. Tanto os animais do grupo controle como os imunizados com rHsp60 apresentaram sinais de morbidade, como caquexia e pêlos arrepiados. Além disso, nos ensaios experimentais iniciais, todos os animais vieram a óbito.

Hsp60 recombinante, apesar de ter sido utilizada com sucesso na imunização contra diferentes microorganismos (Yamaguchi *et al.*, 2003; Noll e Autenrieth, 1996), também há relatos onde não se verifica proteção (Bae *et al.*, 2002; Héchard *et al.*, 2004). Não há uma explicação porque proteínas tão conservadas como as Hsp60 tenham eficácia tão distinta quando utilizadas como antígenos vacinais. Além disso, é difícil estabelecer uma comparação a este respeito entre as Hsp60s de diferentes microorganismos utilizadas com este propósito, já que os protocolos de vacinação, doses e vias utilizadas foram os mais diversos (Tabela 8).

No caso da imunização utilizando rHsp60 de *C. pseudotuberculosis*, a explicação para a ausência de proteção após o desafio pode ser uma consequência da resposta imunológica gerada. A proteção contra *C. pseudotuberculosis* é dependente de uma resposta adaptativa humoral e celular. A resposta humoral contra bactérias intracelulares pode neutralizar os microorganismos antes que eles tenham acesso às células. Além disso, anticorpos anti-Hsp60 ativam o sistema complemento, favorecendo a eliminação bacteriana.

Entretanto, altos níveis de anticorpos neutralizantes não estão sempre associados com proteção (Vanniasinkam *et al.*, 2004).

A neutralização e a opsonização bacteriana podem não ocorrer (Hécharde *et al.* 2004), o que foi observado para bactérias como a *C. pseudotuberculosis*, em que a resolução da infecção depende de uma resposta Th1 (Milan *et al.*, 2004). Isto se deve ao fato do alvo a estes anticorpos, a Hsp60, ser um antígeno intracelular. Assim, elas não são acessíveis ao sistema imunológico. Isto parece ser verdadeiro para Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*, já que não há resposta humoral contra este antígeno em caprinos imunizados com uma linhagem virulenta de *C. pseudotuberculosis*.

A resposta unicamente humoral não é capaz de resolver a infecção contra *C. pseudotuberculosis*. Assim como outras bactérias intracelulares (Milan *et al.*, 2004), a resolução da infecção depende de uma resposta celular, especialmente tipo Th1. A citocina INF- γ , produzida em altos níveis neste tipo de resposta, é essencial para a ativação de macrófagos; estes são responsáveis pela eliminação da infecção por *C. pseudotuberculosis*. Como a citocina INF- γ não foi produzida após a terceira imunização, a resposta imunológica gerada não teve uma ação eficiente sobre a infecção com a bactéria em questão.

4.3. PARTE 3

**Desenvolvimento da vacina de DNA baseada
no gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis***

4.3.1. Clonagem do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* no vetor de expressão eucarioto (pVAX-1)

4.3.1.1. Clonagem do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* no vetor pTOPO:Blunt

A fim de construir o vetor pVAX1:*hsp60* a ser utilizado como vacina de DNA, primeiramente o gene em questão foi amplificado e clonado no vetor pTOPO:Blunt. Para isso, os iniciadores foram desenhados de forma a conter sítios de restrição artificiais nas extremidades 5' e 3'. O iniciador senso foi ainda acrescido da seqüência de "Kozak"; cujo consenso (-6 GCCA/GCCAUGG+4; Garmory *et al.*, 2003) pode influenciar positivamente o reconhecimento do transcrito pelos ribossomos (Azevedo *et al.*, 1999). Segundo os autores, a maior eficiência de tradução ainda está relacionada com a presença da base purina na posição -3 e/ou de uma guanidina na posição +4.

A reação de amplificação gênica gerou um fragmento de aproximadamente 1642 pb (Fig. 31). O fragmento de peso molecular desejado foi então purificado a partir do gel de agarose, sendo, posteriormente, clonado no vetor pTOPO:Blunt. Esta amostra foi dialisada e utilizada para transformar *E. coli* TOP10. A cultura transformada foi plaqueada e os clones brancos obtidos foram testados quanto à presença do inserto por PCR e digestão enzimática. A identidade de bases de alguns destes clones foi confirmada pelo seqüenciamento (dados não apresentados).

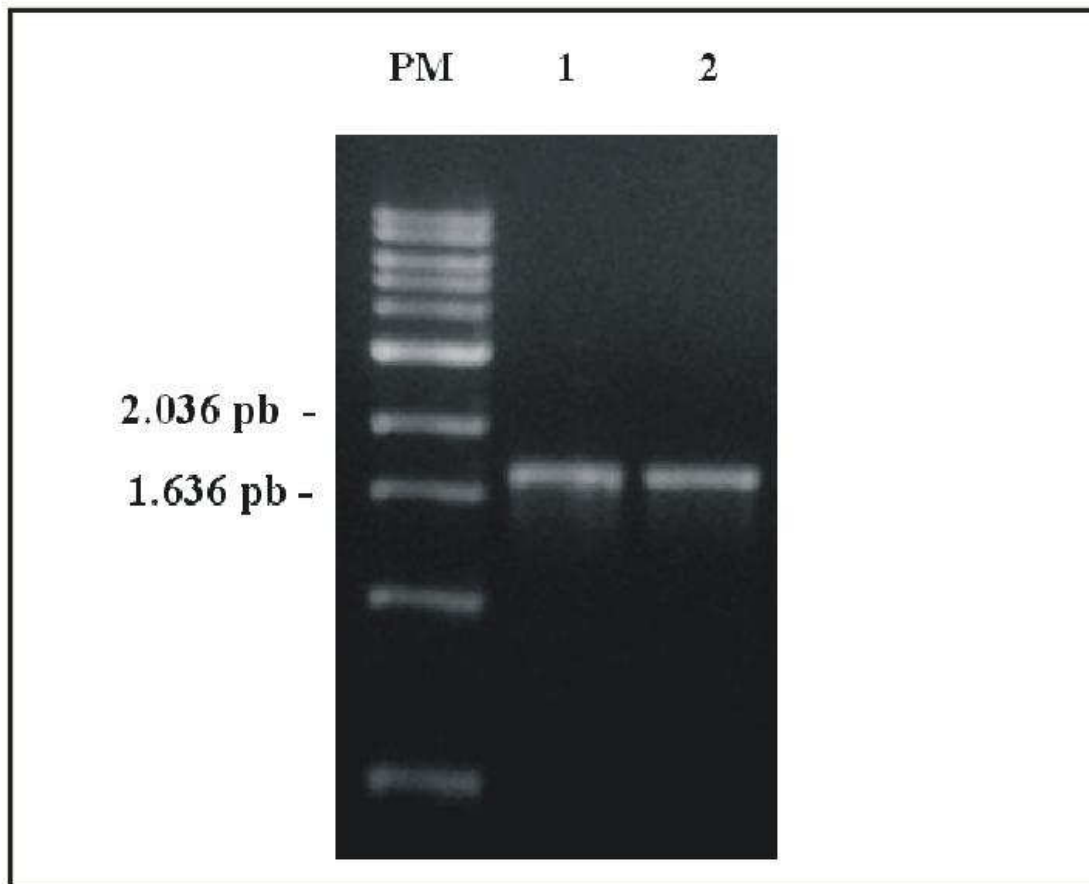


Figura 31: Amplificação do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* utilizando os iniciadores com os sítios de restrição para posterior clonagem direcional no vetor de expressão eucarioto pVAX1. Gel de agarose a 1% mostrando o produto da reação de amplificação, a qual teve como molde o vetor pTOPO:*hsp60*. PM: Padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen); Canaletas 1 e 2: amplificação do gene *hsp60*.

4.3.1.2. Sub-clonagem do gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* no vetor de expressão eucarioto (pVAX1)

O passo seguinte à clonagem de *hsp60* no vetor pTOPO:Blunt consistiu na transferência do fragmento referente a este gene modificado para um vetor capaz de expressá-lo em células eucariotas. Para tanto, adotou-se o vetor pVAX1 (Invitrogen) (Fig. 32).

Para a subclonagem, os vetores pVAX1 e pTOPO:*hsp60e* foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e fracionados em gel de agarose a 1%. As bandas correspondentes a *hsp60* e à forma linear de pVAX1 foram excisadas do gel e os fragmentos de DNA correspondentes foram purificados. As amostras foram então ligadas e usadas para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10. Foram obtidas colônias brancas, as quais foram testadas quanto à presença do inserto por PCR e digestão enzimática. Destas, algumas amostras foram seqüenciadas. Como não houve alterações de bases (dados não apresentados), o clone "5" foi escolhido aleatoriamente para ser utilizado nas imunizações como a vacina de DNA.

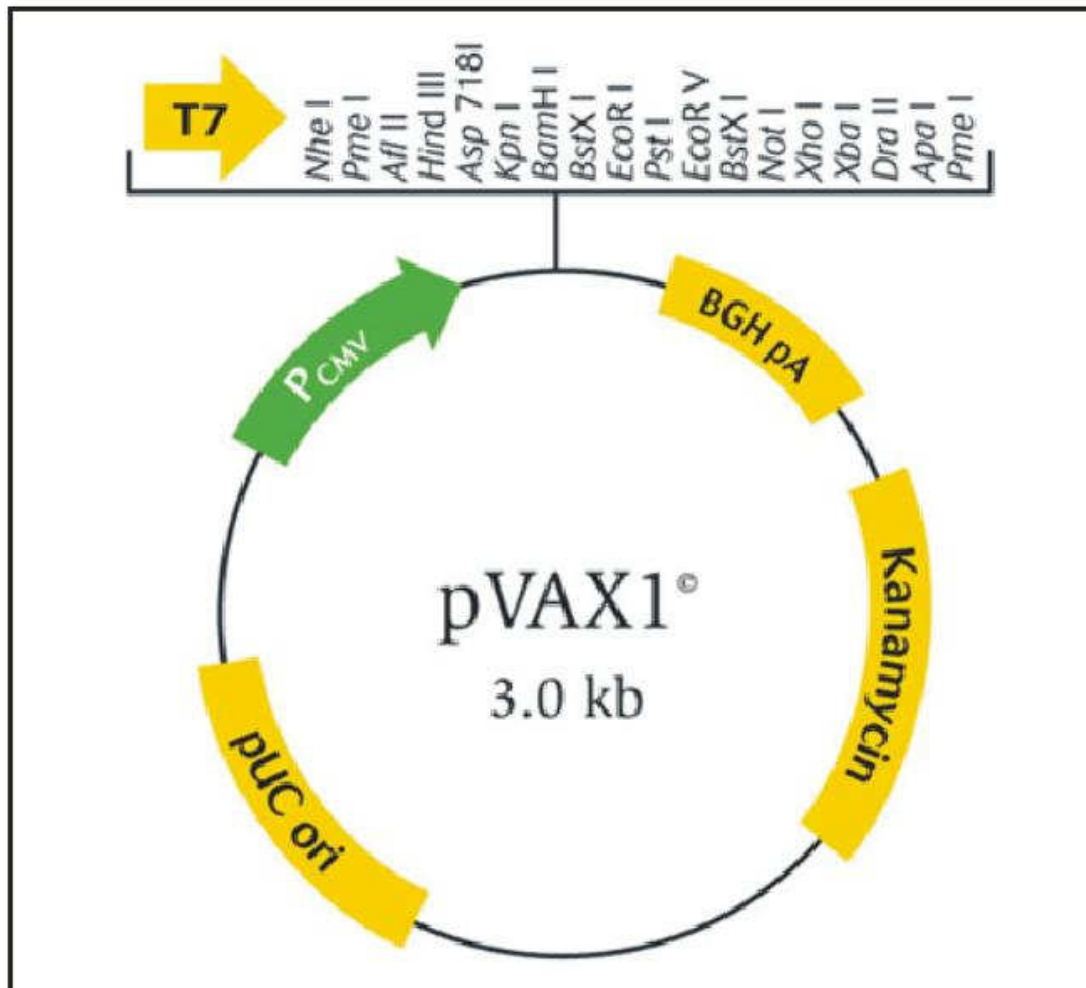


Figura 32: Mapa do vetor pVAX1. Este vetor possui todos os elementos genéticos necessários para a expressão gênica em células eucariotas, como a sequência promotora do citomegalovírus humano (CMV), que permite altos níveis de expressão; o sinal de poliadenilação da sequência codificadora do hormônio bovino (BGH), que confere maior eficiência na terminação da transcrição e da poliadenilação do RNA mensageiro. Além disso, este vetor foi construído de acordo com as normas do “Food and Drug Administration (FDA)”. Contém somente as sequências necessárias à replicação em *E. coli* ou para a expressão em células de mamíferos.

4.3.1.3. Produção e purificação dos vetores pVAX1 e pVAX1:*hsp60* a serem utilizados como vacina de DNA

Antes de iniciar o processo de imunização, primeiramente foi necessária a extração e purificação dos vetores pVAX1 e pVAX1:*hsp60*. Para isto, foi utilizado o Kit EndoFree Plasmid (Qiagen, Valencia, CA). Após o processo de extração em larga escala (giga-prep), os plasmídeos foram ressuspensos em solução salina e dosados em espectrofotômetro. O rendimento obtido foi de 7 mg/mL, sendo que a relação entre A_{260}/A_{280nm} foi de 1,8, o que caracteriza um DNA puro. A qualidade do DNA foi ainda analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Fig. 33).

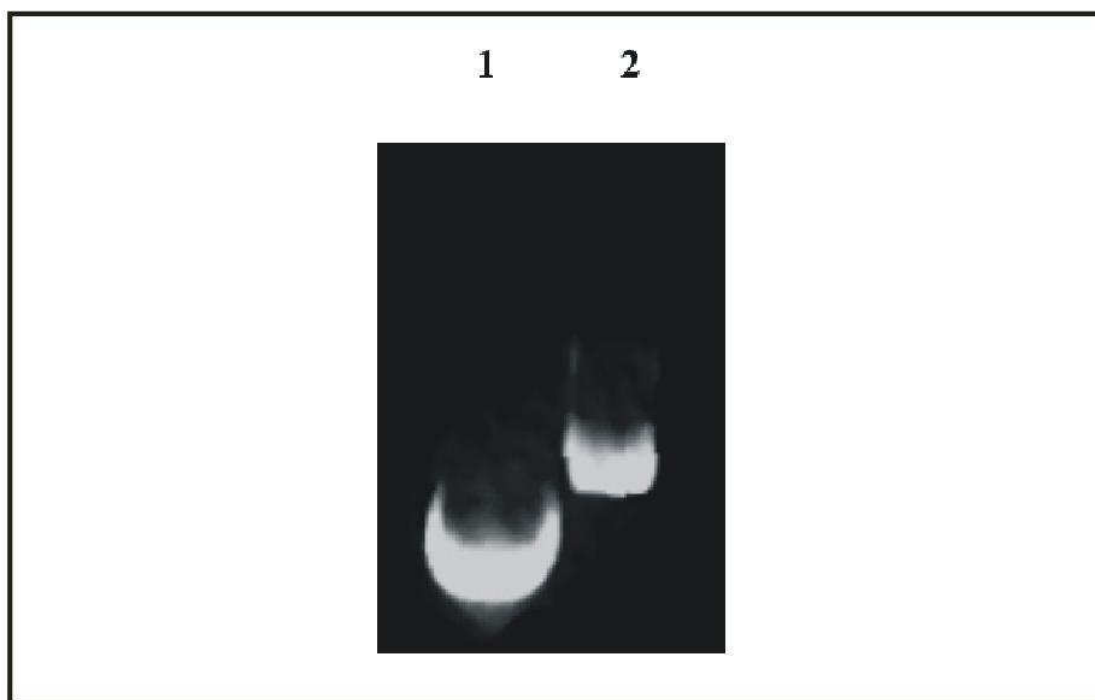


Figura 33: Análise da extração e purificação em larga escala dos vetores pVAX1 e pVAX1:*hsp60*. Os vetores foram obtidos após giga-prep utilizando o Kit EndoFree Plasmid (Qiagen, CA, Valencia). O material foi analisado em gel de agarose a 1%. Canaleta 1:pVAX; canaleta 2:pVAX:Hsp60.

Observa-se que além do processo de extração ter sido quantitativamente significativo, do ponto de vista qualitativo o DNA se encontra em um estado superenrolado. De acordo com Cupillard *et al.* (2005), pelo menos 70% do DNA administrado como vacina de DNA deve estar superenrolado para induzir o perfil imunológico adequado. Além disso, preparações com pelo menos 90% de DNA superenrolado resultam em maiores níveis de transfecção se comparadas à preparações com apenas 60% (Krieg *et al.*, 1998).

Ainda sob o ponto de vista qualitativo, é importante ressaltar que durante a extração dos plasmídeos, o Kit utilizado apresenta um tampão que possui substâncias com ação quelante de endotoxinas. O LPS é uma endotoxina capaz de induzir respostas imunológicas inespecíficas. Além disso, esta toxina se liga ao mesmo receptor que as Hsp60, desencadeando respostas imunológicas semelhantes. A contaminação por LPS ainda apresenta o inconveniente de diminuir a expressão do plasmídeo transfectado (Krieg *et al.*, 1998). Portanto, a ausência de contaminação por LPS evita a geração de respostas inespecíficas após a imunização e possibilita maiores níveis de expressão.

4.3.2. Imunização com a vacina de DNA

Após obter os vetores a serem utilizados como vacina de DNA, iniciou-se a imunização. A escolha de uma vacina de DNA baseada no gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis* se deve aos resultados obtidos com a vacina de DNA tendo como gene o *hsp65* de *M. leprae*. Em ensaios experimentais, camundongos BALB/c imunizados com esta vacina foram protegidos contra *M. tuberculosis* após

o desafio por via endovenosa. Além do efeito profilático, a vacina ainda demonstrou efeito terapêutico (Silva *et al.*, 2005).

Afim de avaliar a proteção conferida pela imunização com a vacina de DNA baseada no gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*, camundongos BALB/c foram imunizados com 4 doses de 100 µg de DNA plasmidiano por via intra-muscular. A resposta humoral induzida pela vacina de DNA foi avaliada. A vacina de DNA possui vantagens como a possibilidade de apresentar antígenos via MHC I e, portanto, de gerar uma resposta CTL potente e de longa duração. As vacinas de proteínas recombinantes geralmente não são apresentadas por essa via e geram, preferencialmente, uma resposta humoral ao invés de celular (Liu, 2003). Além disso, as vacinas de DNA apresentam seqüências imunoestimulatórias, os motivos CpG, os quais geralmente polarizam a resposta para Th1. Esta se caracteriza principalmente pela alta produção de INF-γ. Este tipo de resposta é ideal para gerar uma resposta imunológica protetora contra *C. pseudotuberculosis*.

4.3.2.1. Avaliação do perfil de resposta humoral induzida pela imunização com a vacina de DNA em modelo murino

O nível de produção do isótipo IgG anti-rHsp60 nos animais imunizados com a vacina de DNA foi avaliado através do ensaio imunoenzimático do tipo indireto. Além de IgG, a produção de seus subtipos IgG2a e IgG1 também foi avaliada.

A produção de IgG e IgG1 anti-Hsp60 pelos animais imunizados com o vetor pVAX1:*hsp60* foi estatisticamente significativa após a segunda dose da vacina em relação ao grupo controle (Fig. 34A e 34B). No caso de IgG2a, este resultado já é observado a partir da primeira imunização (Fig. 34C). A partir deste resultado, pode-se afirmar que a imunização com a vacina de DNA induz a produção de anticorpos específicos anti-Hsp60 de *C. pseudotuberculosis*.

A produção dos subtipos IgG1 e IgG2a são referentes à produção de anticorpos neutralizantes e de opsoninas, respectivamente. Contudo, a relação IgG2a/IgG1 após a quarta imunização com a vacina de DNA é maior em relação à terceira imunização com a proteína recombinante. O mesmo resultado foi obtido após a imunização de BALB/c com a proteína recombinante e com a vacina de DNA utilizando a Hsp60 de *R. equi*, como antígeno vacinal (Vanniasinkam *et al.*, 2004).

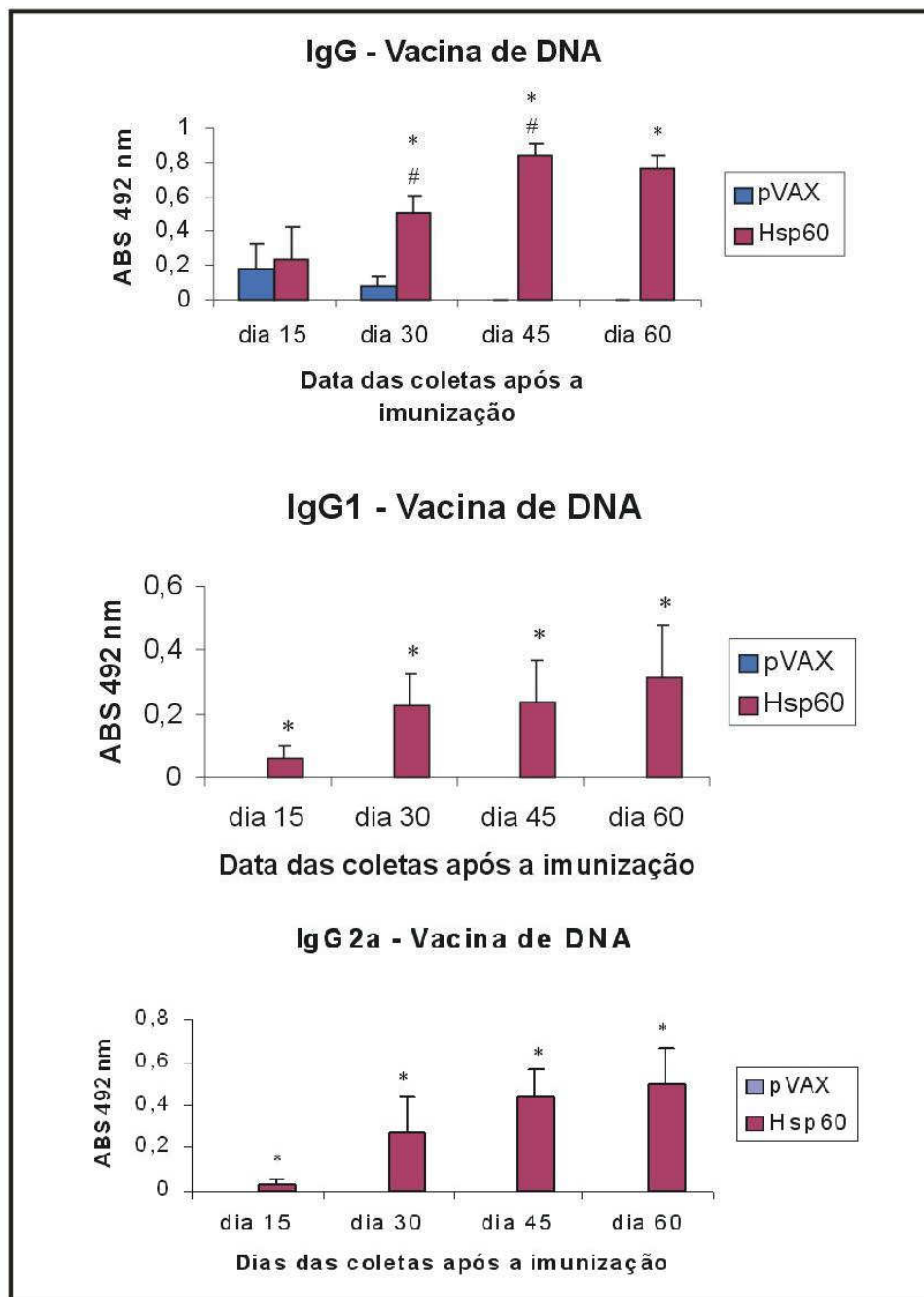


Figura 34: Níveis de produção de (A) IgG, (B) IgG1 e (C) IgG2a anti-Hsp60 pelos camundongos imunizados com a vacina de DNA baseada no gene *hsp60* de *C. pseudotuberculosis*. O soro de 5 camundongos BALB/c foram coletados com 15, 30, 45 e 60 dias após a primeira imunização dos animais com 100 µg por via intra-muscular. Diferenças estatisticamente significativas utilizando o teste "t" de student não pareado ($P < 0,05$) entre os animais imunizados (pVAX1:*hsp60*) e o grupo controle (pVAX1) estão representadas por um asterisco *. Diferenças estatisticamente significativas utilizando o teste ANOVA pos hock Turkey ($P < 0,05$) em relação à coleta anterior estão representadas por #.

4.3.2.3. Análise da proteção dos animais imunizados com a vacina de DNA

Doze dias após a infecção, todos os animais vieram a óbito, incluindo todos os animais imunizados e todos do grupo controle. Com 3 dias após a infecção, os animais começaram a apresentar sinais clínicos de morbidade. Durante as 2 semanas, os animais apresentaram caquexia, pêlos arrepiados (Fig. 39 e 40), cianose, hipotermia e ascite.



Figura 35: Camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA após o desafio. (A) Animais imunizados com pVAX1; (B) Animais imunizados com pVAX1:hsp60.

Vacina de DNA baseada no gene *hsp60* de diferentes microorganismos tem sido utilizada com sucesso na imunização contra diferentes microorganismos (Lowrie *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 2003). Contudo, também há relatos onde não se verifica proteção, mesmo em casos onde a resposta imunológica gerada pela imunização foi a requerida para a proteção (Leclercq *et al.*, 2002; Vanniasinkam *et al.*, 2004). Assim como discutido para a vacina recombinante, não há uma explicação para a ausência de proteção. Os protocolos de vacinação, doses e vias utilizadas são os mais diversos (Tabela 8); o que não permite

estabelecer uma comparação precisa entre os diversos fatores envolvidos na geração de uma resposta eficiente após a imunização gênica.

A proteção contra *C. pseudotuberculosis* é dependente de uma resposta adaptativa humoral e celular. A resposta humoral contra bactérias intracelulares pode neutralizar os microorganismos antes que eles tenham acesso às células. Mesmo tendo mais opsoninas em relação à imunização com a proteína recombinante, que favorecem a eliminação bacteriana, não houve proteção. Os níveis de opsonina podem não ter alcançado os níveis requeridos para gerar uma resposta protetora. Ainda, a explicação pode ser a mesma como discutido para a proteína recombinante; antígenos intracelulares não estariam acessíveis à resposta humoral.

Somente a resposta humoral não é capaz de resolver a infecção por *C. pseudotuberculosis*. Respostas protetoras contra esta bactéria são mediadas principalmente por uma resposta celular, especialmente linfócitos TCD8. A citocina INF- γ é essencial para a ativação de macrófagos. Mesmo que o processo de imunização gênica tenha induzido os componentes requeridos contra *C. pseudotuberculosis*, a ausência de proteção pode ocorrer se a vacinação não induziu uma resposta imunológica específica imediatamente após a infecção. Assim, o microorganismo seria hábil em se disseminar pelo organismo, induzindo os sinais patológicos vistos após a infecção (Vanniasinkam *et al.*, 2004).

A linhagem de camundongos utilizada também deve ser considerada. A proteção obtida após a imunização com Hsp60 difere entre as linhagens de camundongos utilizadas (Lowrie *et al.*, 1997). Apesar de a imunização de BALB/c

com Hsp65 de *M. leprae* proporcionar proteção após o desafio com *M. tuberculosis*, esta linhagem de camundongos é mais susceptível a bactérias intracelulares. Isto se deve à incapacidade destes animais de gerar uma resposta rápida e vigorosa do tipo Th1 (Noll e Autenrieth, 1996), induzindo preferencialmente Th2 (Vanniasinkam *et al.*, 2004). Portanto, o componente genético dos animais experimentais também pode ter influenciado o desenvolvimento de uma resposta imunológica adequada.

Outro fator relevante é o fato de os actinomicetos terem 2 cópias do gene *hsp60* no genoma. Estes genes ortólogos, aparentemente com funções distintas, podem ter propriedades imunológicas diferentes. A cópia 2 dos actinomicetos parece ter maior nível de expressão após exposição a estresses (de León *et al.*, 1997) e ser mais imunodominante sobre a cópia 1 (Rinke de Wit *et al.*, 1992). Contudo, este fato não pode ser afirmado para *Corynebacterium*, já que não há um estudo comparativo entre elas e nem de utilização destas proteínas como antígenos vacinais. Barreiro *et al.* (2005) verificaram somente que em condições de estresse térmico, as duas cópias têm maiores níveis de expressão em *C. glutamicum*. Somente a diferença entre as cópias pode não ser explicação para os diferentes resultados obtidos em teste de imunização, pois, mesmo tendo sido a cópia 2 de *M. leprae* que conferiu proteção contra o desafio por *M. tuberculosis*, a cópia 2 de *R. equi* foi utilizada sem sucesso na imunização contra este microorganismo (Vanniasinkam *et al.*, 2004).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRELLO,S.; MAYS, A.; OLIVEIRA, P.M.A. Manual Merck de Veterinária. 2001. Editora ROCA, São Paulo, 8ªed.

ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R. Linfadenite caseosa – Recomendações e Medidas Profiláticas. *Sociedade Nacional de agricultura*, ano 100, Artigo Técnico [on line]. 1997. Disponível em: <<http://www.snagricultura.org.br/artigos/artitec-caprino.htm>>

ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; PIRES, P.C. Linfadenite caseosa: patogenia-diagnóstico- controle, Artigo Técnico. 1997. Documento nº 27, Embrapa Sobral CE, Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

AL-RAWASHDEH, O.F.; AL-QUDAH, K.M. Effect of shearing on the incidence of caseous lymphadenitis in Awassi sheep in Jordan, *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.*, v. 47, p. 287–293. 2000

ARSENAULT, J.O.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D. O.; GALARNEAU, J.-R.; BOISCLAIR, J., SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada, *Prev. Vet. Med.*, v. 59 , p. 67–81. 2003

AUGUSTINE, J.L.; RENSHAW, H.W. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in axenic purulent exudate on common barnyard fomites, *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 713–715. 1986

AZEVEDO, V.; LEVITUS, G.; MIYOSHI, A.; CÂNDIDO, A. L.; GOES, A. M.; OLIVEIRA, S. C. Mains features of DNA-based immunization vectors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 147-153. 1999

BAE, J.E.; SCHURIG, G.G.; TOTH, T.E. Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified *brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. *Veterinary Microbiology*, v. 189-202. 2002

BAIRD, G. Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. *Vet. Rec.*, v.140, p. 611. 1997.

BARREIRO, C.; GONZÁLEZ-LAVADO, E.; PÁTEK, M.; MARTÍN, J. F. Transcriptional analysis of the *groES-groE1*, *groE2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: Characterization of heat shock induced promoters. *Journal of bacteriology*, v. 186 (14), p. 4813-4817. 2004

BARREIRO, C.; GONZÁLEZ-LAVADO, E.; BRAND, S.; TAUCH, A.; MARTÍN, J. M. Heat shock proteome analysis of wild-type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a spontaneous mutant lacking GroEL1, a dispensible chaperone. *Journal of Bacteriology*, v. 187 (3), p. 884-889. 2005

BEN SAID, M.S.; BEN MAITIGUE, H.; BENZARTI, M.; MESSADI, L.; REJEB, A.; AMARA, A. Epidemiological and clinical studies of ovine caseous lymphadenitis, *Arch. Inst. Pasteur Tunis.*, v. 79, p. 51–57. 2002

BIBERSTEIN, E.L.; KNIGHT, H.D.; JANG, S. Two biotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Vet. Rec.*, v. 89, p. 691–692. 1971

BILLINGTON, S.J.; ESMAY, P.A.; SONGER, J.G.; JOST, B.H. Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 208, p. 41–45. 2002

BINNS, S.H.; BAIRLEY, M.; GREEN, L.E. Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999, *Vet. Rec.*, v. 150, p. 263–268. 2002

BOGDAN, J. R.; NEWLANDS-MONTEITH, C.F.; ELLIS, J.A.; Nitric oxide production following *in vitro* stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 56, p. 299-310. 1997

BONATO, V.L.D.; LIMA, V.M.F.; TASCONE, R.E.; LOWRIE, D.B.; SILVA, C.L. Identification and characterization of protective T cells in Hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice, *Infect. Immun.*, v. 66, p. 169-175. 1998

BRAIG, K. Chaperonins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 8, p. 159-165. 1998

BROGDEN, K.A.; CHEDID, L.; CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; SACKS, J. Effect of muramyl dipeptide on immunogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* whole-cell vaccines in mice and lambs, *Am. Vet. Res.*, v. 51, p. 200-202. 1990

BROWN, C.C.; OLANDER, H.J.; BIBERSTEIN, E.L.; MORSE, S.M. Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 1116–1119. 1986

BUCK, G.A.; CROSS, R.E.; WONG, T.P.; LOERA, J.; GROMAN, N. DNA relationships among some *tox*-bearing corynebacteriophages, *Infect. Immun.*, v. 49, p. 679–684. 1985

BUXTON, A.; FRASER, G. *Corynebacterium*, in: Buxton A., Fraser G. (Eds.), *Animal Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh, 1977, pp. 177–183.

CARNE, H.R.; ONON, E.O. Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels, *Nature*, v. 271, p. 246-248. 1978

CARRIO, M. M.; VILLAVERDE, A. Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett.*, v. 537 (1-3), p. 215-221. 2003

CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M.; EFSTRATIOU, A.; DOVER, L.G.; HOLDEN, M.T.G.; PALLAN, M.; BENTLEY, S.D.; BESRA, G.S.; CHURCHER, C.; JAMES, K.D.; De ZOYSA, A.; CHILLINGWORTH, T.; CRONIN, A.; DOWD, L.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; MOULE, S.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; RUTHERFORD, K.M.; THOMSON, N.R.; UNWIN, L.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G.; PARKHILL, J. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129, *Nucleic Acids Res.*, v. 31, p. 6516-6523. 2003

CHAPLIN, P.J.; De ROSE, R.; BOYLE, J.S.; McWATERS, P.; KELLY, J.; TENNENT, J.M.; LEW, A.M., SCHERLINCK, J.-P.Y. Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep, *Infect. Immun.*, v. 67, p. 6434–6438. 1999

COLLETT, M.G.; BATH, G.F.; CAMERON, C.M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections, in: Collett M.G., Bath G.F., Cameron C.M. (Eds.), *Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa*, Oxford University Press, v. 2, p. 1387-1395. 1994

CONNOR, K.M.; QUIRIE, M.M.; BAIRD, G.; DONACHIE, W. Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis, *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 2633–2637. 2000

COSTA, L.R.R.; SPIER, S.J.; HIRSH, D.C. Comparative molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* of different origin, *Vet. Microbiol.*, v. 62, p. 135–143. 1998

COYLE, M.B.; LIPSKY, B.A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects, *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 3, p. 227–246. 1990

CUPILLARD, L.; JUILLARD, V.; LATOUR, S.; COLOMBET, G.; CACHET, N.; RICHARD, S.; BLANCHARD, S.; FISHER, L. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine*, v. 14 (16), p. 1910-6, 2005

DE LA CRUZ, F.; DAVIES J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria, *Trends Microbiol.*, v. 8, p. 128-33. 2000

DE LEO, P.; MARCO, S.; ISIEGAS, C.; MARINA, A.; CARRASCOSA, J. L.; MELLADO, R.P. *Streptomyces lividans* *groES*, *groEL1* and *groEL2* genes *Microbiology*, v. 143, p. 3563–3571. 1997

De ROSE, R.; TENNENT, J.; McWATERS, P.; CHAPLIN, P.J.; WOOD, P.R.; KIMPTON, W.; CAHILL, R.; SCHEERLINCK, J.P. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 90, p. 55-63. 2002

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, *Vet. Res.*, v. 37, p. 201–218. 2006

EGEN, N.B.; CUEVAS, W.; McNAMARA, P.J.; SAMMONS, D.W.; HUMPHREYS, R.; SONGER, J.G. Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing, *Am. J. Vet. Res.*, v. 50, p. 1319–1322. 1989

EGGLETON, D.G.; MIDDLETON, H.D.; DOIDGE, C.V.; MINTY, D.W. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells, *Aust. Vet. J.*, v. 68, p. 317-319. 1991

ELLIS, J.A.; HAWK, D.A.; MILLS, K.W.; PRATT, D.L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 28, p. 303-316. 1991

EOM, C. Y.; KIM, E.; RO, Y. T.; KIM, S. W.; KIM, Y. M. Cloning and molecular characterization of *groESL* heat-shock operon in Methylophilic bacterium *Methylovorus* sp. Strains SS1 DSM 11726. *Journal of Biochemistry and molecular biology*, v. 38 (6), p. 695-702. 2005

FARIA, G.A.; MORAIS, O.R.; GUIMARÃES, P.H.S. Análise da ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Sebrae. Relatório técnico [on-line]. 2004. Disponível em: <www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovinocaprinocultura.pdf>.

FERNÁNDEZ, E.P.; VELA, A.I.; Las HERAS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F.; MORENO, M.A. Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis, *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 18, p. 571– 574. 2001

GARMORY, H. S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R. W. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genetic Vaccines and Therapy*, v. 1; p. 1-5. 2003

GROMAN, N.; SCHILLER, J.; RUSSELL, J. *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* responses to DNA probes derived from corynephage and *Corynebacterium diphtheriae*, *Infect. Immun.*, v.45, p. 511–517. 1984

GULLO, C. A.; TEOH, G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunology letters*. V. 94, p. 1-10. 2004

HARD, G.C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*, *J. Med. Microbiol.*, v. 5, p. 483–491. 1972

HÉCHARD, C.; GRÉPINET, O.; RODOLAKIS, A. Molecular cloning of the *Chlamydomonas abortus groEL* gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *Journal of Medical Microbiology*. V. 53; p. 861-868. 2004

HECKER, M.; SCHUMANN, W.; VOLKER, U. Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, v. 19, p. 417-428. 1996

HENNEQUIN, C.; PORCHERAY, F.; WALIGORA-DUPRIET, A.J.; COLLIGNON, A.; BARC, M. C.; BOURLIOUX, P.; KARIALAINEN, T. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology*, v. 147, p. 87–96. 2001

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

HOLSTAD, G. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in goats. IX. The effect of vaccination against natural infection, *Acta Vet. Scand.*, v. 30, p. 285-293. 1989

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 593. 1994

HOU, X.-G.; KAWAMURA, Y.; SULTANA, F.; HIROSE, K.; MIYAKE, M.; OTSUKA, Y.; MISAWA, S.; OGURI, T.; YAMAMOTO, H.; EZAKI, T. Genetic identification of members of the genus *Corynebacterium* at genus and species levels with 16S rDNA-targeted probes, *Microbiol. Immunol.*, v. 41, p. 453–460. 1997

IRWIN M. R.; KNIGHT H. D. Enhanced resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections associated with reduced serum immunoglobulin levels in levamisole-treated mice. *Infection and Immunity*, v. 12, p. 1098-1103. 1975

JOLLY, R.D. The pathogenesis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in mice, *N. Z. Vet. J.*, v. 13, p. 141–147. 1965

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

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Patologia Veterinária. 2000. Ed. Manole, 6ª edição.

JONES, B.W.; HELDWEIN, K.A.; MEANS, T.K.; SAUKKONEN, J.J.; FENTON, M. J.; Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. Ann. Rheum. Dis., v. 60 Suppl 3, p. 6-12. 2001

JONES, D.; COLLINS, M.D. Irregular, nonsporing Gram-positive rods, in: Smeath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1261–1282. 1986

KALINOWSKI, J.; BATHE, B.; BARTELS, D.; BISCHOFF, N.; BOTT, M.; BURKOVSKI, A.; DUSCH, N.; EGGELING, L.; EIKMANN, B.J.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; HARTMANN, M.; HUTHMACHER, K.; KRMAER, R.; LINKE, B.; McHARDY, A.C.; MEYER, F.; MOCKEL, B.; PFEFFERLE, W.; PUHLER, A.; REY, D.A.; RUCKERT, C.; RUPP, O.; SAHM, H.; WENDISCH, V.F.; WIEGRABE, I.; TAUCH, A. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins, J. Biotechnol., v. 104, p. 5-25. 2003

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species, J. Clin. Microbiol., v. 42, p. 3925–3931. 2004

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*, J. Clin. Microbiol., v. 43, p. 1934–1936. 2005

KIM, B.J.; LEE, S.H.; LYU, M.A.; KIM, S.J.; BAI, G.H.; KIM, S.J.; CHAE, G.T.; KIM, E.C.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.H. Identification of Mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*), *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, p. 1714–1720. 1999

KIM, S. N.; KIM, S.W.; PYO, S. N.; RHEE, D. K. Molecular cloning and characterization of *groESL operon in Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Cells*, v. 11 (3), p. 360-368. 2001

KOFFAS, M.; STEPHANOPOULOS, G. Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology, *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 16, p. 361-6. 2005

KRIEG, A. M.; YI, A.K.; SCHORR, J.; DAVIS, H. L. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends in Microbiology*, v. 6(1), p. 23-27. 1998

KUCHANNY-ARDIGÒ, D. E.; LIPINSKA, B. Cloning and characterization of the *groE* heat-shock operon of the marine bacterium *Vibrio harveyi*. *Microbiology*. v. 149, p. 1483-1492. 2003

KUCHANNY, D.; KLEIN, G.; KRZEWSKA, J.; LIPINSKA, B. Cloning of the *groE* operon of the marine bacterium *Vibrio harveyi* using a lambda vector. *Acta Biochim. Polon.*, v. 45, p. 261-270. 1998

KUSUKAWA, N.; UEMORI, T.; ASADA, K.; KATO, I. Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, v. 9, p. 66-68. 1990

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

LAPORT, M. S.; SANTOS, L.L.; LEMOS, J. A. C.; BASTOS, M. C. F.; BURNE, R. A.; GIANBIAGI-DEMARVAL, M. Organization of heat shock *dnaK* and *groE* operons of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. *Research in Microbiology*, v. 157, p. 162-168. 2006

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

LECLERQ, S.; HARMS, J. S.; ROSINHA, G. M. S.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunization with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. *J. Med. Microbiol.* V. 51; p. 20-26, 2002

LEE, W. T.; TERSLESKY, K. C.; TABITA, F. R. Cloning and characterization of two *groESL* operons of *Rhodobacter sphaeroides*: transcriptional regulation of the heat-induced *groESL* operon. *J. Bacteriol.*, v.179, p. 487-495. 1997

LEWIN, B. *Genes VIII*. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall. 2004

LIMA, K. M.; BONATO, V. L. D.; FACCIOLI, L. H.; BRANDÃO, I. T.; SANTOS, S. A.; COELHO-CASTELO, A. A. M., LEÃO, S. C.; SILVA, C. L. Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. *Vaccine*, v. 19, p. 3518-3525. 2001

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

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

LIU, M. A. DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine*, v. 253, p. 402-410. 2003

LOWRIE, D. B.; SILVA, C. L.; RAGNO, C. S.; TASCONE, R. E. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*. V. 15 (8), p. 834-838. 1997

MATTOS-GUARALDI, A.L.; MOREIRA, L.O.; DAMASCO, P.V.; HIRATA JUNIOR, R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world--an overview, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.v. 98, p. 987-93. 2003

McLENNAN, N.; MASTERS, M. GroE is vital for cell-wall synthesis. *Nature*, v. 392, p. 139, 1998.

McLENNAN, N. F.; GIRSHOVICH, A. S.; LISSIN, N. M.; CHARTES, Y.; MASTERS, M. The strongly conserved conserved carboxyl-terminus glycine-methionine motif of the *Escherichia coli* GroEL chaperonin is dispensable. *Mol. Microbiol.*, v. 7, p. 49-58. 1993

McGUFFIN, L.J.; BRYSON, K.; JONES, D.T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, v.16, p. 404-405, 2000

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

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

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

MILAN, R.; ALOIS, R.; JOSEF, C.; JANA, B.; EVZEN, W. Recombinant protein and DNA vaccines derived from hsp60 *Trichophyton mentagrophytes* control the clinical course of trichophytosis in bovine species and guinea-pigs. *Mycoses*. V. 47, p. 407-417. 2004

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

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification, *Mol. Microbiol.*, v. 26, p. 1005–1011. 1997

MOSELEY, P. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*. V.48; p. 299-302, 2000

MOWAT, N.; RWEYEMAMU, M. Vaccine manual, the production and quality control of veterinary vaccines for use in development countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations, n° 35, FAO. 1997

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

MUSTAFA, A. S. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Molecular Immunology*, v. 39, p. 113-119. 2002

NABERHAUS, F. Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol. Microbiol.*, v. 38, p. 1-8. 1999

NISHIO, Y.; NAKAMURA, Y.; KAWARABAYASHI, Y.; USUDA, Y.; KIMURA, E.; SUGIMOTO, S.; MATSUI, K.; YAMAGISHI, A.; KIKUCHI, H.; IKEIO, K.; GOJOBORI, T. Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*, *Genome Res.*, v. 13, p. 1572-9. 2003

NOLL, A.; AUTENRIETH, I. B. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. *Infection and Immunity*. V. 64 (8), p. 2955-2961. 1996

OJHA, A.; ANAND, M.; BHATT, L.; JACOBS, W.R.; HATFULL, G. F. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in *Mycobacteria*. *Cell*. V. 123, p. 861-873, 2005

OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W.; BURET, A.G.; READ, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Can. J. Vet. Res.*, v. 66, p. 86-92. 2002

PATON, M.W.; ROSE, I.R. HART, R.A.; SUTHERLAND, S.S.; MERCY, A.R., ELLIS, T.M.; DHALIWAL, J.A. New infection with *Corynebacterium pseudotuberculosis* reduces wool production, *Aust. Vet. J.*, v. 71, p. 47-49. 1994

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

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

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

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

PEEL, M.M.; PALMER, G.G.; STACPOOLE, A.M.; KERR, T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review, *Clin. Infect. Dis.*, v. 24, p. 185–191. 1997

PEPIN, M.; PITTET, J.C.; OLIVER, M.; GOHIN, I. Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *J. Leukoc. Biol.*, v. 56(5), p. 666-670, 1994

PEPIN, M.; SEOW, H.F.; CORNER, L.; ROTHEL, J.S.; HODGSON, A.L.; WOOD, P.R. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet Res.*, v. 28 (2), p. 149-163, 1997.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.52, p. 5. 2000

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents?. Expert Reviews in Molecular Medicine, p. 1-15. 2001

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

PROHÁSZKA, Z.; FÜST, G. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. Molecular immunology, v. 41; p. 29-44. 2004

PUECH, V.; CHAMI, M.; LEMASSU, A.; LANÉELLE, M.-A., SCHIFFLER, B.; GOUNON, P.; BAYAN, N.; BENZ, R.; DAFFÉ, M. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane, Microbiology., v. 147, p. 1365–1382. 2001

QUINTANA, F.J.; COHEN, I.R. DNA vaccines coding for heat-shock proteins (HSPs): tools for the activation of HSP-specific regulatory T cells. Expert Opinion Biology Therapy, v. 5(4), p. 1-10. 2005

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. Ed. Guanabara, Koogan, 9ª edição, 2002.

RAJARAM, H.; BALLAL, A. D.; APTE, S. K.; WIEGERT, T.; SCHUMANN, W. Cloning and characterization of the major *groESL* operon from a nitrogen-fixing

cyanobacterial *Anabaena* sp. Strain L-31. *biochim. Biophys. Acta*, v. 1519, p. 143-146. 2001

REGIS, L. Aspectos da resposta celular de caprinos a antígeno somático e antígeno secretado de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2001. 85f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador

RADFORD, S. E. GroEL: more than just a folding cage. *Cell*, v. 125, p. 831-833. 2006

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

RIEGEL, P.; RUIMY, R.; DE BRIEL, D.; PRÉVOST, G.; JEHL, F.; CHRISTEN, R.; MONTEIL, H. Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae* and related taxa, with recognition of *Corynebacterium ulcerans* sp. nov. nom. rev., *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 126, p. 271–276. 1995

RINKE DE WIT, T. F.; BEKELIE, S.; OSLAND, A.; MIKO, T. L.; HERMANS, P. W.; VAN SOOLINGEN, D.; DRIJFHOUT, J. W.; SCHONINGH, R.; JANSON, A.A.; THOLE, J. E. Mycobacteria contain two *groEL* genes: the second *Mycobacterium leprae* gene is arranged in an operon with *groES*. *Molecular Microbiology*, v. 6, p. 1995-2007. 1992

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ed. Cold Spring Harbor, CSHL Press. 1989

SEGAL, G.; RON, E. Z. Heat shock activation of the *groESL* operon of *Agrobacterium tumefaciens* and the regulatory roles of the inverted repeat. *J. Bacteriol.*, v. 178, p. 3634-3640

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

SHAMS, H. Recent developments in veterinary vaccinology. *The Veterinary Journal*, v. 170, p. 289-299. 2005

SILVA, C. L. The potencial use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. *Microbes and Infection*, v.1, p. 429-435. 1999

SILVA, C.L.; BONATO, V. L. D.; COELHO-CASTELO, A. A. M.; LIMA, K. M.; JÚNIOR, J. M. R. Vacinas gênicas. *Genômica. Atheneu*. 2004

SILVA, C.L.; BONATO, V.L.; COELHO-CASTELO, A.A.; SOUZA, A.O.; SANTOS, S.A.; LIMA, K.M.; FACCIOLI, L.H.; RODRIGUES, J.M. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial Hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice, *Gene Ther.*, v. 12, p. 281-287. 2005

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.; LIBBY, S.J.; IANDOLO, J.J.; CUEVAS, W.A.](#), Cloning and expression of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis* in *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, v. 58, p. 131-6. 1990

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

STANDFORD, K.; BROGDEN, K.A.; MC CLELLAND, L.A.; KOZUB, G.C.; AUDIBERT, F. The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines, Can. J. Vet. Res., v. 62, p. 38–43. 1998

SUTHERLAND, S.S.; HART, R.A.; BULLER, N.B. Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms, Vet. Microbiol., v. 49, p. 1–9. 1996

TAKAHASHI, T.; MORI, Y.; KOBAYASHI, H.; OCHI, M.; KIKUCHI, N.; HIRAMUNE, T. Phylogenetic positions and assignments of swine and ovine corynebacteria isolated based on the 16S rDNA sequence, Microbiol. Immunol., v. 41, p. 649–655. 1997

TANAKA, N.; HIYAMA, T.; AKAMOTO, H. Cloning, characterization and functional analysis of *groESL* opero from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. Biochimica et biophysica acta. V. 1343, p. 335-348. 1997

TASHJIAN, J.J.; CAMPBELL, S.G. Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study, Am. J. Vet. Res., .v. 44, p. 690–693. 1983

TAUCH, A.; KAISER, O.; HAIN, T.; GOESMANN, A.; WEISSHAAR, B.; ALBERSMEIER, A.; BEKEL, T.; BISCHOFF, N.; BRUNE, I.; CHAKRABORTY, T.; KALINOWSKI, J.; MEYER, F.; RUPP, O.; SCHNEIKER, S.; VIEHOEVER, P.; PUHLER, A. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora, J. Bacteriol., v. 187, p. 4671-4682. 2005

VAN EDEN, W.; KOETS, A.; VAN KOOTEN, P.; PRAKKEN, B.; DER ZEE, R. Immunopotentiating heat shock proteins: negociators between innate danger and control of autoimmunity. *Vaccine*, v. 21, p. 897-901. 2003

VAN EDEN, W.; VAN DER ZEE, R.; PRAKKEN, B. Heat shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, p.318-330. 2005

VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; DE BRIEL, D.; MONTEIL, H.; VERSCHRAEGEN, G.; DE ROUCK, A.; CLAEYS, G. Evaluation of applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*, *Res. Microbiol.*, v. 146, p. 633–641. 1995

VANNIASINKAM, T.; BARTON, M. D.; HEUZENROEDER, M. W. The immunogenicity of *Rhodococcus equi* GroEL2 based vaccines in a murine model. *Veterinary immunology and immunopathology*. V. 98, p. 91-100. 2004

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; ZINK, R.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Characterization of the *groEL* and *groES* loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional and phylogenetic analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70 (10), p. 6197-6209. 2004

WALKER, J.; JACKSON, H.J., EGGLETON, D.G.; MEEUSEN, E.N.T.; WILSON, M.J.; BRANDON, M.R. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis, *Infect. Immun.*, v. 62, p. 2562-2567. 1994

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

WILSON, M.J.; BRANDON, M.R.; WALKER, J. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Infect. Immun.*, v. 63, p. 206-211. 1995

WONG, H.C.; LU, K. H. Cloning, sequencing and expression of GroEL-like protein gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 37, p. 203-207. 2004

YAMAGUCHI, H.; OSAKI, T.; TAGUCHI, H.; SATO, N.; TOYODA, A.; TAKAHASHI, M.; KAI, M.; NAKATA, N.; KOMATSU, A.; ATOMI, Y., KAMIYA, S. Effect of bacterial flora on postimmunization gastritis following oral vaccination of mice with *Helicobacter pylori* heat shock protein 60. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 10(5), p. 808-812. 2003

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N.Y.; CHIZOV-GINBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies, *Vet. Q.*, v. 18, p. 87–89. 1996

YERUHAM, I.; FRIEDMAN S.; PERL S.; ELAD, D.; BERKOVICH, Y.; KALGARD, Y. A herd level analysis of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* outbreak in a dairy cattle herd, *Vet. Dermatol.*, v. 15, p. 315–320. 2004

ZANIN-ZHOROV, A.; TAL, G.; SHIVTIEL, S.; COHEN, M.; LAPIDOT, T.; NUSSBAUM, G.; MARGALIT, R.; COHEN, I. R.; LIDER, O. Heat Shock Protein 60 Activates Cytokine-Associated NegativeRegulator Suppressor of Cytokine Signaling 3 in T Cells: Effects on Signaling, Chemotaxis, and Inflammation. *The Journal of Immunology*, v. 175, p. 276-285. 2005

ZÜGEL, U.; KAUFMANN, S. H. E. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12(1), p. 19-393.1999

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)