

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e sua caracterização através de Genomic Survey Sequence (GSS).

VÍVIAN D'AFONSECA DA SILVA

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**

CO-ORIENTADOR: **Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

VÍVIAN D'AFONSECA DA SILVA

Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e sua caracterização através de Genomic Survey Sequence (GSS).

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte - MG

Fevereiro - 2008

Dedico esta dissertação ao meu lindo filho Marcus Vinícius, meu orgulho, à minha irmã Thaís Cláudia, melhor amiga, ao meu cunhado Luis Alberto, a minha madrinha Abadia e ao meu tio preferido, Jordão, que partiu, durante a escrita desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Família:

- À Deus primeiramente, fonte de toda luz, amor e paz que encontrei sempre nos caminhos que trilhei. Deus sempre esteve comigo!;
- Aos meus pais Haroldo e Eloísa, que não mediram esforços para que esse trabalho pudesse ser realizado e sempre me apoiaram em todas as decisões;
- Ao meu filho Marcus Vinícius, por todas as horas de descontração, de brincadeiras, cumplicidade, amizade e amor. Pela primeira vez senti meu coração pulsar fora de mim!!!;
- À minha querida irmã Thaís e ao meu cunhado Luis Alberto, que me acolheram e foram os meus alicerces, meu porto seguro durante todo o tempo que precisei;
- À minha linda afilhada, Maria Luisa, minha princesinha!!!
- Aos meus irmãos Guilherme e Rodrigo, pelo companheirismo e vibrações positivas sempre;
- A toda minha família, tios, primos, padrinhos, por toda ajuda, por tanto carinho;
- Ao pai do meu filho, Vinícius, pela ajuda, por ter acreditado tanto em mim, pelo amor verdadeiro;
- A toda minha segunda família, Tânia, Ricardo, Vanessa e Wagner, tios, primos, pelo apoio, amizade e carinho;
- A toda minha terceira família Rosemary, Lúcio, Júnia e Giullia, pelo acolhimento;
- Aos novos amigos e aos antigos pela grande amizade;

Trabalho:

- Ao Prof. Dr. Vasco Azevedo, pelas enormes oportunidades, pela orientação, por ter sempre acreditado em mim e no meu trabalho, por todos os ensinamentos, ensinamentos fundamentais na minha formação;
- Ao Prof. Dr. Anderson Miyoshi, pela orientação, por tantos conselhos, pelos ensinamentos, pela ajuda na elaboração de todos os trabalhos, na bancada ou na escrita, por me ajudar na minha formação;
- Ao Prof. Dr. José Miguel Ortega, Dr. Francisco Prosdocimi e sua equipe pela ajuda na elaboração do trabalho;
- Ao Dr. Guilherme Oliveira, pela atenção e por viabilizar a realização de parte do trabalho;
- Às queridas amigas Luciana Oliveira e Elisângela Coser (Renée Rachou), por todaaaaa ajuda!;

- Ao meu 'IC' preferido, Pablo Moraes, por ter sido tão aplicado, interessado, por ter tornado as tardes mais agradáveis, pela amizade e claro pelo trabalho confiável, realizado com responsabilidade;
- À Gabriela Burle, NAGE, por sempre me ajudar principalmente na bancada e pela sua amizade;
- À Pós-Graduação em Genética, a Todos os professores da nossa pós-graduação;
- À Marina, por toda paciência, pelas grandes ajudas ao longo do curso e pela amizade;
- À minha nova e querida amiga Sítia Almeida, pela força incomensurável para a elaboração da dissertação e pela amizade;
- Aos colegas de curso, pelas idéias e energia positiva;
- E claro ao Laboratório de Genética Celular e Molecular, sinônimo de trabalho, competência, amizade e companheirismo. A todos vocês membros do LGCM o meu especial muito obrigado por toda nossa história em comum:

- Alessandra	- Núbia Seyffert
- Clarissa Rocha	- Pablo Moraes
- Eduardo Capanema	- Paula Gonçalves
- Fernanda Dorella	- Sarah Viguetti
- Fernanda Lima	- Sítia Almeida
- Kátia Morais	- Siomar Soares
- Luis Gustavo Pacheco	- Tarciana Teixeira
- Marcela Pacheco	- Thiago Castro
- Marcelle Almeida	

- A todos vocês o meu **MUITO OBRIGADO!!!!!!!**

“Somos uma temível mistura de ácidos nucléicos e lembranças, de desejos e de proteínas. O século que termina ocupou-se muito de ácidos nucléicos e de proteínas. O seguinte vai concentrar-se sobre as lembranças e os desejos. Saberá ele resolver essas questões?”

(Jacob)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
I. APRESENTAÇÃO.....	
I.1. Colaboradores	
I.2. Introdução geral	
I.3. Estrutura do manuscrito	
II. REVISÃO DE LITERATURA	
II.1. Etiologia	
II.1.1. O grupo CMN	
II.1.2. Gênero <i>Corynebacterium</i>	
II.1.3. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
II.1.4. Aspectos microbiológicos	
II.1.5. Propriedades Bioquímicas	
II.1.6. Taxonomia de <i>C. pseudotuberculosis</i>	
II.2. Linfadenite Caseosa	
II.2.1. A doença	
II.2.2. Impactos sócio-econômico da LC	
II.2.3. Epidemiologia	
II.2.4. Transmissão	
II.2.5. Relatos de casos em humanos	
II. 2.6. Determinantes da virulência de <i>C. pseudotuberculosis</i>	
II.2.6.1. Fosfolipase D.....	
II.2.6.2. Lipídeos tóxicos da parede celular	
II.2.6.3. Novos genes candidatos	
II.2.7. Diagnóstico	
II.2.8. Tratamento e profilaxia	
II.2.9. Vacinas contra LC.....	
II.2.9.1. Vacinas comerciais	
II.2.9.2. Vacinas de subunidade protéica e gênica	
II.2.10. Geração de mutantes atenuados	
II.3. Genômica	19
II.3.1. Genômica no Brasil	20
II.3.2.Genomas seqüenciados de <i>Corynebacterium</i>	21
	26
	26
	26

II.3.3. Genômica comparativa entre espécies do gênero <i>Corynebacterium</i> ..	
II.3.3.1. Características gerais	
II.3.3.2. Compartilhamento de genes entre as espécies do gênero	
II.3.4. Estratégias moleculares baseadas na geração de GSSs para	
identificação gênica	
II.3.5. Pangenômica	
III.OBJETIVOS	
III.1. Objetivos gerais	
III.2. Objetivos específicos	
IV.RESULTADOS E DISCUSSÃO	
IV.1. ARTIGO: Genome organization and gene content of <i>C.</i>	
<i>pseudotuberculosis</i>	
V.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	
V.1. Conclusões	
V.2. Perspectivas	
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	
VII. ANEXOS	
VII.1. MATERIAIS E MÉTODOS	
VII.1. 1.Equipamentos utilizados	
VII.1.2. Reagentes e soluções	
VII.1.2.1. Reagentes químicos e analíticos	
VII.1.2.2. Soluções	
VII.1.3. Meios de cultura	
VII.1.4. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo	
VII.1.5. Extração de DNA genômico bacteriano	
VII.1.6. Resolução eletroforética	
VII.1.7. Construção da biblioteca genômica de <i>C. pseudotuberculosis</i>	
VII.1.7.1. Fragmentação do DNA genômico por nebulização	
VII.1.7.2. Obtenção de fragmentos de DNA com “pontas “cegas (Blunt-	
end repair)	
VII.1.7.3. Desfosforilação dos fragmentos de DNA	
VII.1.7.4. Confeção de <i>E. coli</i> eletrocompetente	
VII.1.7.5. Ligaçao dos insertos genômicos no vetor	
VII.1.7.6. Transformação de <i>E. coli</i>	
VII.1.7.7. Estocagem dos clones positivos	86
IV.7.8. Extração do DNA plasmidiano de <i>E. coli</i>	86
VII.1.7.9. Confirmação da presença e tamanho do insertos genômicos	

de <i>C. pseudotuberculosis</i> no vetor	
VII.1.8. Geração de Genomic Survey Sequence (GSS)	
VII.1.8.1. Reação de sequenciamento	
VII.1.8.2. Precipitação de nucleotídeos não incorporados	
VII.1.8.3. Sequenciamento das amostras	
VII.1.9. Análises <i>in silico</i> das GSS geradas	
VII.1.9.1. Remoção de seqüências de baixa qualidade	
VII.1.9.2. Remoção de região com similaridade a vetores	
VII.1.9.3. Montagem de “contigs” e alinhamento das GSS	
VII.1.9.4. Análises de similaridade	
VII.1.9.5. Caracterização gênica <i>in silico</i> de grupos biológicos funcionais	
VII.1.9.6. Análises comparativas utilizando o UNIPROT	
VII.1.10. Genômica comparativa	
VII.1. 10.1. Análises de similaridade entre <i>C. pseudotuberculosis</i> e outras quatro espécies do gênero	
VII.1.10.2. Uso de banco de dados para inferências de novas prováveis exclusivas proteínas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	
VII.1.10.3. Análise de sintenia entre <i>C. pseudotuberculosis</i> e outras quatro espécies do gênero	
VII.1.10.4. Confirmação por PCR de prováveis genes exclusivos de <i>C.</i> <i>pseudotuberculosis</i>	
VII.3. ARTIGO: Mini Review	
VII.3.1. A description of genes of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> useful in diagnostics and vaccine applications.....	
VII.4. Currículo	

LISTA DE ABREVIATURAS

INSTITUIÇÕES

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
ICB - UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
ICS - UFBA	Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

TERMOS TÉCNICOS

BHI	“ <i>Brain Heart Infusion</i> ” – Infusão Cérebro Coração
CIP	Coleção Instituto Pasteur
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Grama
GET	Solução Glicose:EDTA:Tris-base
GSS	“ <i>Genome Survey Sequence</i> ”
HCl	Ácido Clorídrico
Kb	Mil pares de bases
μFD	Capacitância por unidade
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
LB	Meio Lúria-Bértani
LC	Linfadenite Caseosa
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
NaOAc	Acetato de Sódio

NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
OHMS	Unidade de Resistência elétrica
O.N.	“ <i>Overnight</i> ” – durante a noite
pb	Pares de bases
PCR	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ” – Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietileno glicol
Psi	“ <i>Pound per square inch</i> ”- Libra-força por polegada quadrada
RPM	Rotações por minuto
seg	Segundos
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colônia
V	Voltagem

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Panorama mundial dos projetos genomas	02
FIGURA 2: Distribuição filogenética de projetos genomas bacterianos	03
FIGURA 3: Teste bioquímico das linhagens de <i>C. pseudotuberculosis</i> realizado no sistema Api Coryne.....	11
FIGURA 4: Classificação dos países envolvidos em projetos Genomas.....	21
FIGURA 5: Imagem esquemática da estrutura de um pangenoma.....	29
FIGURA 6: Aparelho nebulizador para fragmentação mecânica do DNA.....	82
FIGURA 7: Construção da biblioteca genômica de <i>C. pseudotuberculosis</i> . Transformação de <i>E. coli</i> com os fragmentos genômicos de <i>C. pseudotuberculosis</i> e seleção dos clones positivos.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Propriedades bioquímicas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	09
TABELA 2: Projetos genomas do grupo CMN.....	23
TABELA 3: Linhagens bacterianas utilizadas no trabalho.	80
TABELA 4: Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR das 4 GSS's provavelmente exclusivas de <i>C. pseudotuberculosis</i>	93

RESUMO

O gênero *Corynebacterium* consiste em um grande número de bactérias Gram-positivas que são pleomórficas, não esporulam e com um alto conteúdo. Este gênero incluem também espécies patogênicas de plantas e animais, bactérias do solo não-patogênicas e espécies saprófitas. Um dos membros mais importantes deste gênero é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um patógeno intracelular, o qual causa a doença denominada Linfadenite Caseosa (LC) em cabras e ovelhas. A ampla ocorrência e a importância econômica dessa doença têm impulsionado os estudos da sua patogênese. Entretanto, as bases genéticas da virulência de *C. pseudotuberculosis* ainda são pouco caracterizadas. Neste contexto, para obter mais informação sobre o patógeno aproximadamente 1.440 GSSs (Genomic Survey Sequence) de *C. pseudotuberculosis* linhagem T2 foram geradas e então submetidas a análises computacionais. As análises resultaram em aproximadamente 1.000 GSSs com os tamanhos entre 100 a 790 nucleotídeos. Utilizando seqüências não-redundantes foi demonstrada uma sintonia conservada entre *C. pseudotuberculosis* e *C. diphtheriae*. Quando as seqüências obtidas foram comparadas as outras quatro espécies do gênero *Corynebacterium*, *C. pseudotuberculosis* apresentou maior similaridade ao nível de aminoácido do que ao nível de DNA. Foram também demonstradas a presença de genes como *oppD* e PIP que provavelmente codificam a proteína Dipeptídeo/ABC transportador e Imino-peptidase, respectivamente. Análises filogenéticas mostraram que *C. pseudotuberculosis* apresenta estreita relação com o patógeno humano, *C. diphtheriae*.

ABSTRACT

The *Corynebacterium* genus consists of a large number of Gram-positive bacteria that are pleiomorphic, non-sporeforming with high GC contents. This genus also included plant-pathogenic, animal-pathogenic, nonpathogenic soil bacteria and saprophytic species. One of the most important members of this genus is the bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, an intracellular pathogen which causes the illness called Caseous Lymphadenitis (CL) in sheeps and goats. The widespread occurrence and the economic importance of this disease have prompted investigation of its pathogenesis. However, the genetic basis of *C. pseudotuberculosis* virulence is still poorly characterized. In this context, in order to obtain more information about it, approximately 1,440 GSS's (Genomic Survey Sequences) of *C. pseudotuberculosis* T2 strain were generated and then submitted to computational analyses. Therefore, these analyses resulted in 1,000 GSS's with a length between 100 to 790 nucleotides. Using non-redundant sequences was desmonstrated a conserved sintenia between *C. pseudotuberculosis* and *C. diphtheriae*. When the sequences obtained were compared to the others four species of the *Corynebacterium* genus, *C. pseudotuberculosis* shown to have more similarity at the amino acid level than the DNA level. It was also demonstrated the presence of the *oppD* and PIP genes which codes for Dipeptide/ABC protein and the Proline Iminopectidase respectively. Phylogenetic analysis showed that *C. pseudotuberculosis* presents, a close relationship with the human pathogen, *C. diphtheriae*.

I APRESENTAÇÃO

I.1. Colaboradores

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); e contou com as seguintes colaborações:

- Prof. Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira, chefe do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa Renée Rachou, FIOCRUZ e coordenador da Rede Genoma de Minas Gerais (RGMG);
- Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira, chefe do Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG;
- Prof. Dr. José Miguel Ortega do Laboratório de Biodados do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG;
- Prof. Dr. Roberto Meyer, chefe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA;
- Prof. Dr. Ricardo Wagner Portela, Pesquisador e Professor do Departamento de Biointeração da UFBA;

O mesmo teve o apoio financeiro das seguintes instituições: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG REDE-2829/05) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

I.2. Introdução Geral

A genômica, ciência que estuda a estrutura, função e evolução de genomas e genes, é uma fonte valiosa de ferramentas que contribuem para um melhor conhecimento das funções gênicas, principalmente quando se trata de microrganismos (SALZANO et al., 2004). Tal área gera uma quantidade imensa de informações e os bancos de dados, que não param de crescer, fornecem um avanço no entendimento dos mais vastos e importantes temas, tais como: (i) diversidade e características populacionais; (ii) estrutura de operons; (iii) elementos genéticos móveis (EGM); (iv) transferência lateral de genes (TLG) e (v) informações sobre as complexas relações entre o patógeno e o hospedeiro (BINNEWINES et al., 2006).

Há uma grande quantidade de projetos genoma sendo realizados na atualidade (figura 1). A razão é que seus genomas são compactos e altamente informativos, ou seja,

com maior porcentagem de regiões codificadoras. Em se tratando de bactérias patogênicas, o interesse aumenta, pois podem-se salientar mudanças, ou seja, plasticidade, no mapa genômico como a aquisição de ilhas de patogenicidade (SCHWARTZ, 2000), genes de resistência a antibióticos e implicados na virulência e patogenicidade; os quais podem constituir bons alvos de terapias mais eficazes, desenvolvimento de kits de diagnósticos e vacinas.

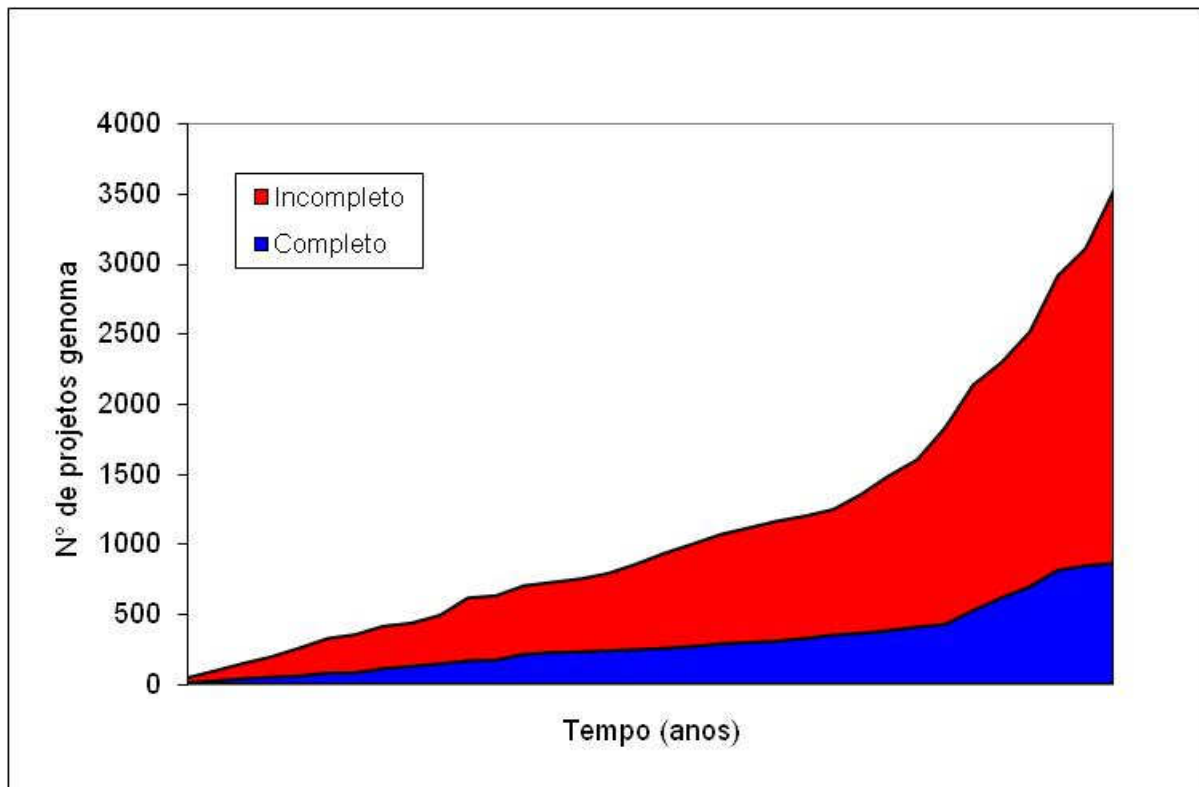


FIGURA 1: Panorama mundial dos projetos genomas, no período de 1995 a 2008. Adaptado de GOLD (*Genomes Online Databases*). [site acessado em 30/01/2008]

No Brasil, a era genômica teve início em 1998, com o seqüenciamento da *Xylella fastidiosa*, primeiro fitopatôgeno a ser seqüenciado no mundo (SIMPSON et al., 2000), dentro de uma rede de pesquisa estadual. Esse projeto contribuiu para que os grupos de pesquisa voltados para a genômica, distribuídos pelo território nacional, se organizassem em uma rede. Assim, o primeiro organismo a ser seqüenciado por uma estrutura de rede nacional, foi o *Chromobacterium violaceum*, em 2001. Já em 2002, a Rede Nacional seqüenciou o genoma de *Mycoplasma synoviae*, agente causador de doenças endêmicas em aves (LOBO et al., 2007); o que fomentou a criação das redes regionais.

Atualmente existem nove destas redes de pesquisa, localizadas em várias regiões brasileiras. Uma delas, a Rede Genoma de Minas Gerais (RGMG) deu início aos seus trabalhos com o transcriptoma do *Schistosoma mansoni*, parasita humano. Em agosto de 2006, a RGMG iniciou mais um projeto genoma de relevância, o seqüenciamento de *Corynebacterium pseudotuberculosis* linhagem 1002. Essa bactéria, Gram-positiva, é um patógeno intracelular facultativo com alto conteúdo G+C (DORELLA et al., 2006a) que infecta geralmente pequenos ruminantes, causando a doença denominada linfadenite caseosa (LC). Dados da literatura confirmam também a infecção humana (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997; LIU et al., 2005).

A escolha deste patógeno foi baseada na sua grande importância econômica e veterinária e, aliado a este fato, atualmente há um crescimento de cerca de 4% em projetos Genoma de Actinobacterias no mundo (figura 2); o que se deve ao fato deste grupo englobar diversos gêneros com grande relevância médica, biotecnológica e veterinária, tais como *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*.

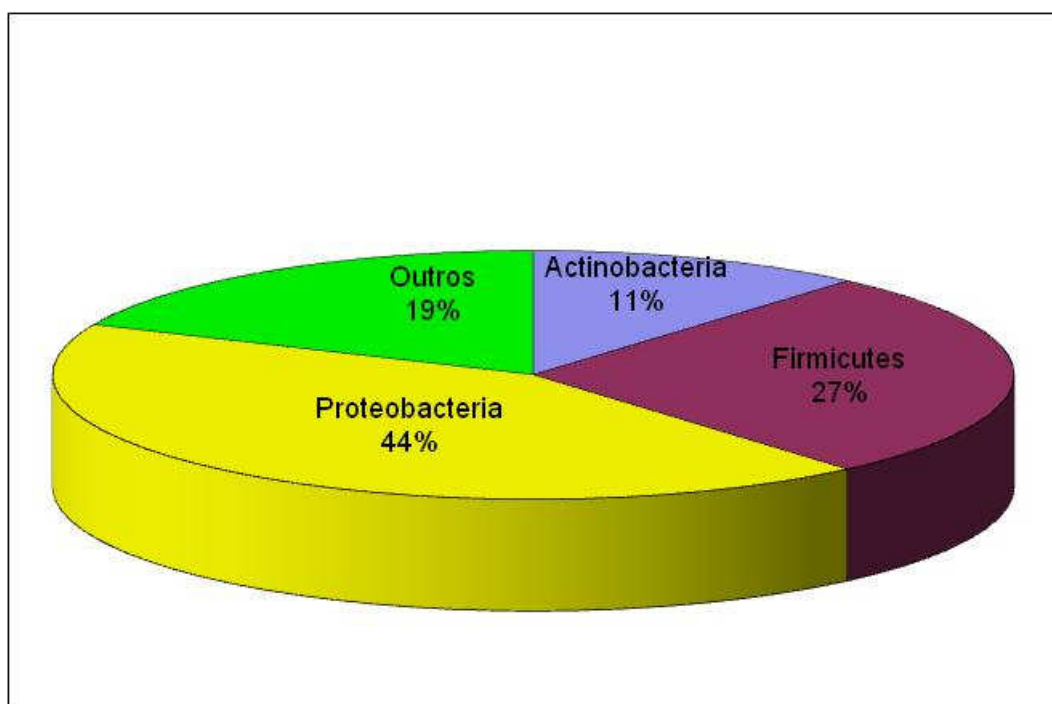


FIGURA 2: Distribuição filogenética de projetos Genoma bacterianos. Adaptado de GOLD (*Genomes Online Databases*). [site acessado em 30/01/2008]

Dentro do gênero *Corynebacterium* existem quatro espécies com o genoma totalmente seqüenciado: *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. efficiens* e *C. glutamicum*. Sabe-se que esses organismos apresentam genomas circulares, com o tamanho entre 2,3 Mpb e 3 Mpb, com ou sem a presença de plasmídeos. Os conteúdos de G+C são altos, variando em

torno de 58% e há uma alta frequência de eventos de transferência horizontal de genes, presença de ilhas de patogenicidade e de fatores clássicos de virulência, como genes de aquisição de ferro. Dessa forma, a genômica comparativa pôde evidenciar que dentro deste gênero a bactéria *C. jeikeium* compartilha muito do seu genoma com todas as outras espécies e apresenta alta plasticidade genômica como, por exemplo, inversões, presentes apenas nessa espécie (DORELLA et al., 2007).

Aliada às informações disponíveis sobre várias espécies do gênero *Corynebacterium*, com os genomas já seqüenciados, torna-se relevante a caracterização e obtenção de dados sobre o genoma de *C. pseudotuberculosis*, o que fornecerá dados para análises de genômica comparativa. O seqüenciamento de *C. pseudotuberculosis* 1002 fornecerá o mapa genético modelo para estudo de genômica comparativa com bactérias de outras espécies.

A pangenômica, o estudo da plasticidade entre genomas de vários isolados da mesma espécie, tem sido atualmente utilizada para análise comparativas entre linhagens. Tais estudos averiguam diferenças e semelhanças entre elas, para estabelecer mudanças no mapa genômico. Para esse fim, a caracterização do genoma de outras linhagens se faz necessário, e foi realizado no presente trabalho, o qual caracteriza um isolado diferente da utilizada no projeto genoma, a *C. pseudotuberculosis* T2.

A caracterização concomitante de várias linhagens de *C. pseudotuberculosis* ainda não foi possível, pois os métodos atuais disponíveis para isso, como o piroseqüenciamento, (tecnologia que utiliza “slides” de fibra ótica com aproximadamente 2 milhões de poços, com detecção nucleotídica realizada pela geração de fótons de luz visível) ainda é de custo elevado (MARGULIES et al., 2005) e ainda não está disponível na Rede Genoma de Minas Gerais.

Outro método disponível é o *Multi Locus Sequence Type* (MLST), o qual realiza uma abordagem pangenômica que tem como objetivo identificar isolados bacterianos com estreita relação filogenética e permitir a reconstrução de eventos de evolução e análises de epidemiologia molecular. Tal técnica é baseada na comparação de seqüências de aproximadamente nove *loci* genéticos, buscando diferenças marcantes entre elas, que distingüa as linhagens (ARVAND et al., 2007). Porém, análises utilizando MLST entre *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* não foram satisfatórios (Francis Bolt- comunicação pessoal) pois os *loci* escolhidos na maioria das vezes são genes “housekeeping”, apresentando muita conservação, inviabilizando assim a diferenciação entre as bactérias suas linhagens.

Por estas razões, realizar uma abordagem genômica utilizando *Genome Survey Sequence* (GSSs - seqüências nucleotídicas parciais provenientes de DNA genômico) que permite a identificação e caracterização de genes (BHATIA et al., 2004), continua ainda sendo a melhor técnica ligada à genômica utilizada no Brasil antes de lançar um projeto genoma. As GSSs são similares às *Expressed Sequence Tag* (ESTs - seqüências geradas pelo seqüenciamento único das extremidades dos insertos de interesse) porém diferem entre si, pois as GSSs são oriundas de DNA genômico, enquanto as ESTs provém de cDNA (DNA complementar) originado de um mRNA (RNA mensageiro). A geração de GSSs, traz outras vantagens como: (i) é uma técnica de baixo custo e alta acurácia; (ii) permite a geração de seqüências genômicas aleatórias; (iii) as seqüências geradas podem então ser oriundas dos mais diversos modelos de clonagens (plasmídeos, cosmídeos, BACs, YACs) e (iv) auxilia na rápida predição gênica auxiliada por análises computacionais.

Com isso, a geração de GSSs para caracterização genômica de *C. pseudotuberculosis* T2 torna possível os estudos de genômica comparativa tanto entre espécies do gênero, quanto entre a linhagem 1002 e outras linhagens que poderão vir a ser seqüenciadas, podendo, assim, auxiliar nos estudos de plasticidade e evolução do genoma de *C. pseudotuberculosis* e auxiliar na identificação de possíveis genes alvos para novas terapias no combate à LC.

I.3. Estrutura do manuscrito

O presente manuscrito de dissertação inicia-se com uma revisão da literatura que foi dividida em três partes. A primeira parte descreve os aspectos gerais do gênero *Corynebacterium*, dando um enfoque sobre a espécie *C. pseudotuberculosis*, descrevendo suas características bioquímicas, microbiológicas e fisiológicas. A segunda parte trata da doença causada por este patógeno, a LC, onde são abordados assuntos como: características gerais da doença, importância e epidemiologia, modo de transmissão, tratamento e profilaxia e a descrição de alguns casos em humanos. A terceira parte, denominada genômica, aborda esta área no Brasil, o andamento de projetos genomas de actinobactérias e trata de algumas características das quatro espécies do gênero *Corynebacterium* que apresentam os genomas já seqüenciados e seus estudos de genômica comparativa. Em seguida, são apresentados os objetivos do trabalho. Os resultados e a discussão encontram-se sob a forma de um artigo científico onde estão descritos todos os resultados obtidos com a construção da mini-biblioteca genômica e as análises *in silico* das GSSs geradas utilizando algoritmos de bioinformática. Por fim, são

apresentadas as considerações finais e as perspectivas deste trabalho. Nos anexos, encontram-se todas as metodologias utilizadas no trabalho, de forma mais detalhada; um artigo, em forma de revisão, apresentando uma lista de genes descritos e suas aplicações; além do currículo, onde estão destacadas as atividades e os trabalhos realizados durante o mestrado.

II

REVISÃO DE LITERATURA

II.1. Etiologia

II.1.1. O grupo CMN

O grupo CMN é um grupo pertencente à família dos actinomicetos e heterogêneo, que apresenta muitas espécies de interesse médico, veterinário e biotecnológico e, por isso, assumem um papel relevante no cenário mundial. Entre elas, destacam-se *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, os agentes etiológicos da tuberculose e da hanseníase, respectivamente.

Este grupo inclui também diversos outros gêneros como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*. Tais bactérias Gram-positivas constituem o grupo denominado CMN, que apresentam muitas características em comum, tais como: (i) presença de ácidos micólicos na parede celular e (ii) alto conteúdo G+C. Os genomas de diversas espécies CMN já foram completamente seqüenciados; este fato reflete a importância médica, veterinária e biotecnológica destes organismos (HARD et al. 1969; PAULE et al., 2004; SONGER et al., 1997).

Quanto ao gênero *Corynebacterium*, destacam-se também *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, os agentes causadores de difteria e infecções nosocomiais (TAUCH et al., 2005); e *C. glutamicum*, altamente utilizada na produção de aminoácidos, como L-aspartato e L-lisina (KOFFAS & STEPHANOPOULOS, 2005).

Para correlacionar microorganismos do gênero *Corynebacterium* com outras bactérias pertencentes à família dos Actinomicetos, foram realizados estudos baseados nas seqüências da subunidade 16S do rRNA ou no gene *rpoB*, que confirmam uma relação inter e intra-específica com outros gêneros, tais como *Rhodococcus*, *Mycobacterium* e *Nocardia*.

A importância destes microrganismos, pertencentes ao grupo CMN, está ligada ao fato de que representam graves problemas de saúde pública (infectam milhares de seres humanos e animais por ano), pois não possuem um método de controle eficaz e causam grandes perdas sócio-econômicas como é o caso da bactéria patogênica *C. pseudotuberculosis*.

II.1.2. Gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium* pertence à família dos Actinomicetos e foi originalmente criado por Lehmann & Neumann (1896) para acomodar o bacilo *C. diphtheriae* e algumas outras espécies patogênicas. Mais tarde, o grupo passou a acomodar diversas outras espécies de bactérias que diferiam em forma, patogenicidade e esporulação (PASCUAL et al., 1995). Este gênero compreende espécies as quais apresentam muitas

características peculiares tais como: (i) serem bactérias Gram-positivas; (ii) apresentarem parede celular com quimiotipos IV (ácido meso-diaminopimélico, arabinose e galactose); (iii) ácidos corineformes; (iv) ácidos graxos de cadeia curta saturados e monosaturados e (v) alto conteúdo G+C (47-74%).

II.1.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O microorganismo *C. pseudotuberculosis*, é uma bactéria Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, pleomórfica, com um tamanho de 0,5-0,6 µm de diâmetro e 1,0 a 3,0 µm de comprimento. Não apresenta capacidade de esporular, possui fímbrias e alto conteúdo G+C. É o agente etiológico causador da patologia conhecida como linfadenite caseosa (LC) ou mal do caroço em pequenos ruminantes (WILLIAMSON, 2001).

Tal microorganismo foi isolado pela primeira vez em 1888, de uma linfagite bovina pelo médico veterinário francês, Edmond Nocard. Em 1891, Hugo von Preisz, isolou uma bactéria similar de um abscesso renal de ovino, daí o nome “enfermidade de Preisz-Nocard”. Em 1918, Ebersson a classificou como difteróide e então a chamou de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

II.1.4. Aspectos microbiológicos

C. pseudotuberculosis é um microorganismo anaeróbio facultativo que apresenta bom crescimento à 37°C em um ambiente com pH 7,0 - 7,2 (SELIM, 2001). É um patógeno que exibe formas cocóides e bastões filamentosos, não forma cápsula, não esporula e é imóvel, porém, apresenta fímbrias, tem crescimento espaçado em meio ágar e se organiza em colônias opacas de crescimento concêntrico e coloração creme-alaranjado. O crescimento em meio líquido desenvolve-se como depósitos granulares (MERCHANT & PACKER, 1967; BUXTON & FRASER, 1977; MUCKLE & GYLES, 1982; DORELLA et al., 2006a).

Outro aspecto microbiológico de relevância é a hemólise variável que ocorre quando a bactéria é crescida em meio ágar-sangue, onde, na presença de *Rhodococcus equi*, apresenta uma hemólise sinérgica. Já na presença de *Staphylococcus aureus*, a toxina produzida por *C. pseudotuberculosis* inibe a ação β-hemolítica estafilocócica (JONES & COLLINS, 1986).

II.1.5. Propriedades Bioquímicas

C. pseudotuberculosis apresenta na parede celular o peptidoglicano do tipo meso-diaminopimérico (meso-DAP). Os açúcares mais abundantes são a arabinose e a galactose e há a presença de ácidos micólicos de cadeia curta, denominados ácidos corineformes (JOLLY, 1965; PUECH et al., 2001; SELIM, 2001). Além disso, as reações bioquímicas dos isolados de *C. pseudotuberculosis* variam consideravelmente, principalmente no que diz respeito à habilidade de fermentação.

TABELA 1: Propriedades bioquímicas de *C. pseudotuberculosis*.

Características Bioquímicas			
Produção de ácido		Hidrólise	
Glicose	+	Esculina	-
Arabinose	d	Hipurato	-
Xilose	-	Uréia	+
Raminose	-	Tirosina	-
Frutose	+	Caseína	-
Galactose	+		
Manose	+	Fosfatase	+
Lactose	-	Pirazinamidase	-
Maltose	+	Vermelho Metil	+
Sacarose	d	Redução de Nitrato	d
Trealose	-	Catalase	+
Rafinose	-	Oxidase	-
Salicina	-	Lipofilismo	-
Dextrina	d		

+: maior que 90% são positivas; d: entre 21-89% são positivas;

-: maior que 90% são negativas ou resistentes.

Ref: Modificado de Dorella et al. 2006 a.

Todas as linhagens de *C. pseudotuberculosis* produzem ácido, mas não produzem gás, provenientes de muitas fontes de carbono tais como: glicose, frutose, maltose, manose e sacarose (MERCHANT & PACKER, 1967; BUXTON & FRASER, 1977; JONES & COLLINS, 1986; HOLT et al., 1994). *C. pseudotuberculosis* é fosfolipase e catalase positiva, oxidase negativa e é beta-hemolítica (MUCKLE & GYLES, 1982; JONES & COLLINS, 1986; SONGER et al., 1988; DORELLA et al., 2006a). Linhagens isoladas de

pequenos ruminantes geralmente não reduzem nitrato (MERCHANT & PACKER, 1967; BUXTON & FRASER, 1977; DORELLA et al., 2006a).

Um teste bioquímico bem estabelecido para identificação de bactérias corineformes é o API Coryne System (API-bioMérieux, Inc., La Balmes Le Grottes, França). Esse método consiste de uma bateria de 21 testes bioquímicos, que podem ser realizados de 24 a 48 horas. O sistema contém 20 tubos com substratos que permitem testes para a presença de 11 enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil, arilamidase, β -galactosidase, fosfatase alcalina, α -glucosidase, N-acetilglucosaminidase, β -glucuronidase, redução de nitrato e hidrólise de esculina e uréia) e oito testes de fermentação de carboidratos (glicose, ribose, D-xilose, manitol, maltose, lactose, sacarose e glicogênio) (DORELLA et al., 2006a) (figura 3).



FIGURA 3: Teste bioquímico de uma linhagem de *C. pseudotuberculosis* realizado no sistema Api Coryne. Procedimento realizado no nosso laboratório.

II.1.6. Taxonomia de *C. pseudotuberculosis*

Originalmente, a classificação de *C. pseudotuberculosis* foi baseada em características bioquímicas e morfológicas (MUCKLE & GYLES, 1982; JONES & COLLINS, 1986). A produção de nitrato redutase foi utilizada por Biberstein et al. (1971) para distinguir o biovar *equi* (isolado de eqüinos e bovinos que apresenta reação positiva para redução de nitrato) do biovar *ovis* (isolado de caprinos e ovinos que apresenta reação negativa para redução de nitrato). Posteriormente, Songer et al. (1988) chegaram à mesma conclusão através de análises do DNA cromossômico por endonucleases de restrição, tais como *EcoRV* e *PstI*.

Mais recentemente, os mesmos resultados foram observados, utilizando polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) do rRNA 16S (VANEECHOUTTE et al., 1995; SUTHERLAND et al., 1996; COSTA et al., 1998). Connor et al. (2000) utilizaram eletroforese em gel submetido à corrente em campo pulsátil (PFGE; Pulse Field Gel Electrophoresis) associado a análises bioquímicas para a caracterização de isolados de *C. pseudotuberculosis* e chegaram às mesmas conclusões.

Outra característica é a estreita relação entre *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*, sugerida pelo fato de ambas apresentarem produção de fosfolipase D (GROMAN et al., 1984; BUCK et al., 1985), presente apenas nas duas espécies em todo o gênero. Além disso, algumas espécies de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* apresentaram a propriedade de produzir a toxina diftérica (TD) e possuem as seqüências nucleotídicas da subunidade 16S do rRNA quase idênticas.

Métodos moleculares como hibridização de ácidos nucléicos e análises de seqüências do gene rRNA 16S foram utilizados para determinar o grau de relação de muitas bactérias corineformes (RIEGEL et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1997; HOU et al., 1997; KHAMIS et al., 2005). Utilizando as seqüências das subunidades menores deste rRNA, presentes apenas no grupo CMN, Riegel et al. (1995) sugeriram que algumas linhagens de *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* pertenciam a um grupo monofilético, e pôde também concluir que os biovars *equi* e *ovis* não deveriam ser classificados como subespécies, pois compartilhavam de alta similaridade no DNA ribossomal.

Mais recentemente, análises utilizando pequenas seqüências da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) tem mostrado mais acurácia na identificação de espécies do gênero *Corynebacterium* do que análises baseadas no gene rRNA 16S (KHAMIS et al., 2004, 2005). Vários estudos sugerem que os dois métodos devam ser empregados 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. (2006b), ao construírem uma árvore filogenética baseada na seqüência do gene *rpoB*, também demonstraram a clara relação filogenética existente entre *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans*.

II.2. Linfadenite caseosa

II.2.1. A doença

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infecto-contagiosa crônica que 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 & PACKER, 1967, PIONTKOWSKI & SHIVVERS, 1998), principalmente em caprinos e ovinos. O conteúdo dos abscessos é rico em material caseoso ou purulento contendo *C. pseudotuberculosis* que pode infectar diretamente outros animais, bem como solo, água e alimentos (GOUVEIA, 1986).

Apesar de *C. pseudotuberculosis* ter sido originalmente identificada como microorganismo causador da LC em caprinos e ovinos, essa bactéria foi também isolada

de outras espécies, incluindo eqüinos (causando a linfagite ulcerativa), pombos, bovinos, camelídeos, suínos, bufalinos e humanos (DORELLA et al., 2007).

II.2.2. Impactos sócio-econômicos da LC

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

II.2.3. Epidemiologia

Além de ser um problema econômico de relevância, a LC é uma enfermidade de ocorrência mundial, ocorrendo principalmente em países como: Austrália, Argentina, Nova Zelândia, África do Sul e Estados Unidos da América (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).

No Brasil, estima-se que a maioria dos rebanhos caprinos esteja infectada. 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 variou entre 3,6 a 10% (LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1991). Minas Gerais, estado que ainda possui um rebanho reduzido, porém, tem apresentado significativo crescimento na atividade de caprinocultura. Estudos epidemiológicos da LC foi realizado em 97 propriedades, através da técnica de ELISA indireto de antígenos secretados de *C. pseudotuberculosis* (CARMINATTI, 2003). Foi observada uma prevalência da doença de 75,8% em caprinos e 79,7% em ovinos (NÚBIA SEYFFERT - comunicação pessoal).

II.2.4. Transmissão

A habilidade de *C. pseudotuberculosis* sobreviver por várias semanas no ambiente parece contribuir para a sua resistência às condições ambientais encontradas nos criadouros (AUGUSTINE & RENSHAW, 1986; YERUHAM et al., 2004). A transmissão entre os animais ocorre principalmente através do contato direto com secreções ou por materiais contaminados. A entrada da bactéria no organismo se dá principalmente 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 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).

II.2.5. Relatos de casos em humanos

A infecção em humanos parece ser um evento raro e em todos os casos relatados tem sido ligada a exposição à *C. pseudotuberculosis* no trabalho pecuário. Cerca de 25 casos de infecção humana já foram descritas na literatura (MILLS et al., 1997; PEEL et al., 1997; LIU et al., 2005) e um caso relatado em 1988, devido à ingestão de carne caprina crua e leite bovino contaminados (PEEL et al., 1997), sendo que a sintomatologia envolve a presença de linfadenite, abscessos e outros sintomas característicos (PEEL et al., 1997). Na maioria dos casos de infecção em humanos os linfonodos afetados foram retirados e os pacientes receberam tratamento a base de antibióticos.

Join-Lambert et al., (2006) relataram um caso de infecção por *C. pseudotuberculosis* em uma criança francesa de apenas 12 anos, ela apresentava quadro de febre e edemas nos linfonodos e fígado. A bactéria foi então identificada através do teste bioquímico API *Coryne* e o paciente submetido a um tratamento prolongado a base de antibióticos.

II.2.6. Determinantes da virulência de *C. pseudotuberculosis*

Pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares e as bases genéticas da virulência em *C. pseudotuberculosis*. Neste contexto, seqüenciamento de *C. pseudotuberculosis* 1002 e a caracterização parcial do genoma da linhagem T2, poderão auxiliar na elucidação de alguns desses mecanismos. A seguir estão descritos alguns genes¹ envolvidos nesses processos.

¹ Para saber mais sobre os genes descritos na literatura, ver artigo de revisão localizado nos anexos deste manuscrito.

II.2.6.1. Fosfolipase D

Fosfolipase D (PLD) é uma potente exotoxina produzida por *C. pseudotuberculosis*, sendo considerada o principal fator de virulência dessa bactéria (HODGSON et al., 1999). Essa exotoxina é um fator de permeabilidade que promove a hidrólise de ligações éster na esfingomiéline da membrana celular das células de mamíferos, possivelmente contribuindo para a dispersão da bactéria do sítio inicial de infecção para sítios secundários dentro do hospedeiro (McNAMARA et al., 1995).

Além disso, a PLD provoca lesões dermonecroticas e em maiores doses é letal para um número variado de cobaias e animais domésticos (SONGER, 1977; EGEN et al., 1989). Tashjian & Campbell, (1983), por meio de ensaios *in vitro*, observaram a destruição de macrófagos de caprinos durante infecção com *C. pseudotuberculosis*; esse efeito letal foi devido à ação da PLD. Várias das atividades biológicas da PLD, bem como sua estrutura molecular, foram também observadas em esfingomielinases presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* (BERNHEIMER et al., 1985; BINFORD et al., 2005).

O papel da PLD na virulência da bactéria ficou evidente após a geração de mutantes *pld*. Estes são incapazes de se disseminarem e, além disso, induzem uma resposta imunológica, embora não totalmente satisfatória, contra *C. pseudotuberculosis* (HODGSON et al., 1992). A geração de diferentes mutantes com *recA* (POGSON et al., 1996) e *aroQ* (SIMMONS et al., 1997), tem sido interessante, já que, dependendo do tipo de atenuação, pode-se afetar mais ou menos a imunogenicidade da linhagem. A geração de mutantes tem como outra finalidade sua utilização como vetores de apresentação de antígenos heterólogos para o sistema imunológico.

II.2.6.2. Lipídeos tóxicos da parede celular

Os lipídeos tóxicos da parede celular de *C. pseudotuberculosis* foram descritos na década de 70 como importantes fatores que contribuem para sua patogênese (HARD, 1972). A toxicidade do material lipídico extraído da parede celular foi demonstrada pela indução de necrose hemorrágica após injeção intradérmica em cobaias (JOLLY, 1966). Um estudo feito em camundongos com 25 isolados de *C. pseudotuberculosis* propôs que existe uma relação direta entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de abscessos crônicos (MUCKLE & GYLES, 1982).

II.2.6.3. Novos genes candidatos

Recentemente foi demonstrado que um grupo de genes envolvidos em absorção de ferro tem um papel relevante na virulência de *C. pseudotuberculosis* (BILLINGTON et al., 2002). Os quatro genes desse provável operón foram identificados próximos ao gene *pld* no genoma dessa bactéria e designados como *fag* A, B, C e D.

Considerando que *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular, essa bactéria deve ser capaz de adquirir ferro em um ambiente onde este nutriente é escasso. Embora não houvesse alteração na utilização de ferro por um mutante *fagB*, *in vitro*, este teve a habilidade diminuída para sobreviver e causar abscessos em cabras infectadas experimentalmente (BILLINGTON et al., 2002).

II.2.7. Diagnóstico

Devido à necessidade de diferenciar *C. pseudotuberculosis* de outros agentes patogênicos envolvidos com a sintomatologia de LC, como *Arcanobacterium pyogenes* e *Pasteurella multocida*, o isolamento dessa bactéria diretamente do material purulento de linfonodos permanece como um dos procedimentos mais fidedignos de diagnóstico (RIBEIRO et al., 2001).

Entretanto, testes mais confiáveis e acurados ainda necessitam ser desenvolvidos. Nesse intuito, foi desenvolvida uma reação de PCR Multiplex (mPCR), para detecção mais rápida e eficiente de *C. pseudotuberculosis* em amostras clínicas de animais portadores de LC. Os genes-alvo da reação são o rRNA 16S, que é o gene de escolha na maioria dos estudos de taxonomia bacteriana, o *rpoB*, um gene que vem sendo amplamente utilizado para análises filogenéticas em microrganismos dos gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium*, e o *pld* (fosfolipase D), que codifica uma exotoxina associada com a virulência tanto de *C. pseudotuberculosis* quanto de *C. ulcerans* e *Arcanobacterium haemolyticum* (PACHECO et al., 2007). Através da utilização desta mPCR, associado a um método de extração de DNA bacteriano diretamente de material caseoso, foi detectada *C. pseudotuberculosis* muito mais rapidamente e de maneira mais específica que quando utilizando cultura bacteriológica e identificação bioquímica de isolados, que é atualmente o padrão-ouro para o diagnóstico da LC (PACHECO et al., 2007).

II.2.8. Tratamento e profilaxia

O padrão de susceptibilidade a agentes antimicrobianos encontrados em *C. pseudotuberculosis* é muito variado, dependendo da fonte de onde foram obtidos. Porém,

estudos anteriores de susceptibilidade mostraram linhagens susceptíveis aos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, lincomicina, gentamicina, tetraciclina, penicilina G e sulfametoxazol-trimetiloprim. Somente uns poucos isolados, apresentam susceptibilidade a neomicina e todas as linhagens são resistentes à estreptomina (MUCKLE & GYLES, 1982).

Diversos estudos importantes estabeleceram os valores de concentração mínima inibitória (CMI), onde os valores foram similares para todos os isolados em relação a 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 CMI para vários agentes antimicrobianos em uma análise de corinebactérias isoladas de mastite em ovelhas. Olson et al. (2002) relataram que *C. pseudotuberculosis* é altamente resistente a qualquer droga quando há a formação de biofilme.

Como mencionado, o tratamento é realizado principalmente através do uso, tanto em animais quanto em humanos, de antibióticos (STANFORD et al., 1998). Contudo, este método não é considerado economicamente viável para uso animal pois possui um custo elevado. O outro agravante é a formação de biofilme que impede a ação de vários antibióticos (OLSON et al., 2002).

Outra opção de tratamento dos animais é a drenagem dos linfonodos superficiais acometidos. Contudo, esta alternativa possui falhas relevantes. A drenagem não elimina 100% das bactérias e 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, permanecendo o controle e a prevenção como estratégias mais viáveis.

Outras medidas são também sugeridas, como o abate 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 pouco eficazes, o controle deve se basear em estratégias que evitem a sua disseminação e entrada nos rebanhos. Desta forma, aliado ao manejo correto, deve-se adotar medidas preventivas eficazes, como a imunoprofilaxia.

II.2.9. Vacinas contra LC

Como descrito anteriormente, o tratamento da LC não é eficaz e é de alto custo, por isso, a imunização seria a medida de melhor custo-benefício para erradicar essa doença. Entretanto, ainda não existe uma vacina eficiente e protetora contra *C.*

pseudotuberculosis. Vários relatos na literatura mostram diferentes estratégias que vêm sendo testadas na tentativa de desenvolver uma vacina que apresente uma imunidade protetora ideal, mas nenhuma ainda alcançou os patamares desejáveis (STANFORD et al., 1998; WILLIAMSON et al., 2001).

Diversas estratégias vacinais contra *C. pseudotuberculosis* vêm sendo testadas. Bactérias atenuadas ou mortas, frações contendo antígenos derivados do envelope celular ou do sobrenadante da cultura bacteriana, bem como uma mistura dos componentes celulares já foram utilizadas (DORELLA et al., 2007). Todas apresentam proteção contra infecções experimentais, contudo os níveis de proteção e a severidade das lesões foram variáveis, o que demonstra a necessidade de se desenvolver uma vacina que ofereça proteção eficiente com diminuição acentuada dos efeitos colaterais.

II.2.9.1. Vacinas comerciais

A maioria das vacinas utilizadas para fins comerciais apresenta a exotoxina fosfolipase D inativada (WILLIAMSON, 2001). No Brasil, uma vacina viva atenuada de *C. pseudotuberculosis*, 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, essa vacina não vem apresentando o mesmo sucesso em testes de campo, sendo bastante variável o nível de proteção obtido, cerca de 83% (PATON et al., 2003).

II.2.9.2. Vacinas de subunidade protéica e gênica

Desde que Carne & Onon (1978) afirmaram que a exotoxina de *C. pseudotuberculosis* era de fato a PLD, vários outros estudos foram então direcionados para a identificação de novos genes candidatos a preparações vacinais contra essa bactéria e diferentes estratégias vêm sendo testadas, como as vacinas vivas recombinantes e as vacinas de DNA, em caprinos e ovinos.

Anticorpos com alta especificidade, produzidos por células secretoras de anticorpos (CSA), obtidas de infecções induzidas em ovinos, foram utilizados como sonda na procura por antígenos celulares de *C. pseudotuberculosis*. Nessa busca foi caracterizada uma protease secretada de 40 quilodáltons (CP40) (WILSON et al., 1995). Porém a resposta imune após vacinação com CP40 não foi caracterizada (WALKER et al., 1994).

II.2.10. Geração de mutantes atenuados

Várias técnicas já foram utilizadas para a geração de mutantes como mutagênese química com ácido fórmico, realizada por Haynes et al. (1992), para produzir PLD inativa. Uma diminuição na virulência foi observada em mutantes obtidos por mutagênese dirigida contra *pld* (KIM et al., 1999). Após o isolamento dos mutantes, testes de virulência foram realizados em camundongos; viu-se que os mutantes tinham habilidade reduzida para estabelecer a infecção e foram incapazes de disseminar-se no hospedeiro.

Já Pogson et al. (1996), produziram um mutante para o gene *recA* de *C. pseudotuberculosis*, utilizando mutagênese sítio-específica. O mutante teve sua eficiência de recombinação homóloga diminuída em 8 a 10 vezes. Contudo, análises *in vivo* revelaram que o gene *recA* mutado não afetava a virulência da bactéria durante a infecção de camundongos. A redução da virulência através de mutantes do gene *aroQ* foi obtida por Simmons et al. (1997), onde foram incapazes de causar os sintomas da LC em modelos murinos.

Dorella et al. (2006c) identificaram 34 mutantes de *C. pseudotuberculosis* através de mutagênese aleatória utilizando o sistema de transposição baseado no TNFuZ (GIBSON & CAPARON, 2002). Este sistema funciona produzindo fusões transcricionais entre o gene da fosfatase alcalina de *Enterococcus faecalis* (*phoZ*) e seqüências codificadoras de proteínas exportadas presentes no genoma da bactéria. Através do seqüenciamento das regiões flaqueadoras das inserções do transposon no DNA genômico dos 34 clones selecionados, Dorella et al. (2006c) identificaram 21 loci que codificam subunidades fimbriais, proteínas de transporte e também proteínas de função hipotética e/ou desconhecida, as quais podem, ou não, estar relacionadas à virulência e à patogenicidade deste microrganismo. Atualmente, estes mutantes vêm sendo testados em ensaios de imunização em camundongos. Resultados recentes têm demonstrado que alguns mutantes oferecem de 60 a 80% de proteção contra o desafio utilizando linhagem virulenta da mesma bactéria (DORELLA - comunicação pessoal).

II.3. Genômica

A compreensão dos mecanismos moleculares, estrutura genômica, arranjo gênico, bem como, mecanismos ligados a patogenicidade de certos microrganismos são alvos de intenso estudo. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem levado à identificação e caracterização de novos genes e vários fatores de virulência, bem como o desenvolvimento de novos agentes microbianos e vacinas. Essas técnicas baseiam-se em

várias estratégias: expressão e transferência gênica, mutações aleatórias ou dirigidas e comparação genômica.

Apesar de todos os estudos realizados em busca de terapias, profilaxias e diagnósticos mais eficazes no controle da LC, a escassez de informação sobre as bases moleculares e fatores de virulência tem prejudicado os avanços na área. Neste contexto, hoje, a genômica tem-se apresentado como uma promissora e acurada alternativa para a rápida predição gênica, e a conseqüente geração de informações de baixo custo. Com isso, as técnicas relacionadas à obtenção de dados genômicos no Brasil tem se tornado uma realidade cada vez mais presente em muitos laboratórios, principalmente aqueles que buscam a identificação de genes alvos para combater doenças causadas por bactérias patogênicas.

II.3.1. Genômica no Brasil

O grande carro-chefe do estudo de genomas foi o advento do seqüenciamento do DNA. Com isso, milhares de organismos estão sendo ou foram estudados por pesquisadores de uma série de países. Hoje, o Brasil já ocupa um lugar de destaque ao lado dos Estados Unidos, França e Japão, como ilustra a figura 5. A exemplo do que é feito em outros países, o Brasil tem colocado seus laboratórios e centros de pesquisa ligados através de uma rede virtual para a troca de informações, compartilhamento e divisão de tarefas.

De acordo com o banco de dados GOLD (www.genomesonline.org), o Brasil encontra-se entre os oito países com a maior demanda de projetos Genoma. As redes de destaque dentro da genômica brasileira são a Rede Genoma Nacional e a Rede Genoma de Minas Gerais, a qual está atualmente seqüenciando o genoma de *C. pseudotuberculosis* linhagem 1002.

Os dados gerados no projeto genoma e os dados obtidos pela geração das GSSs, obtidas no presente trabalho, utilizando outra linhagem da mesma espécie (T2), bem como, a utilização dos dados descritos na literatura sobre as demais espécies do gênero que possuem o genoma já seqüenciado, poderão, então, auxiliar na elucidação dos fenômenos de virulência e patogenicidade e no entendimento de como ocorrem eventos de transferência horizontal de genes, perdas, ganhos, inversões, e compreender assim a plasticidade inter e intra gênero.

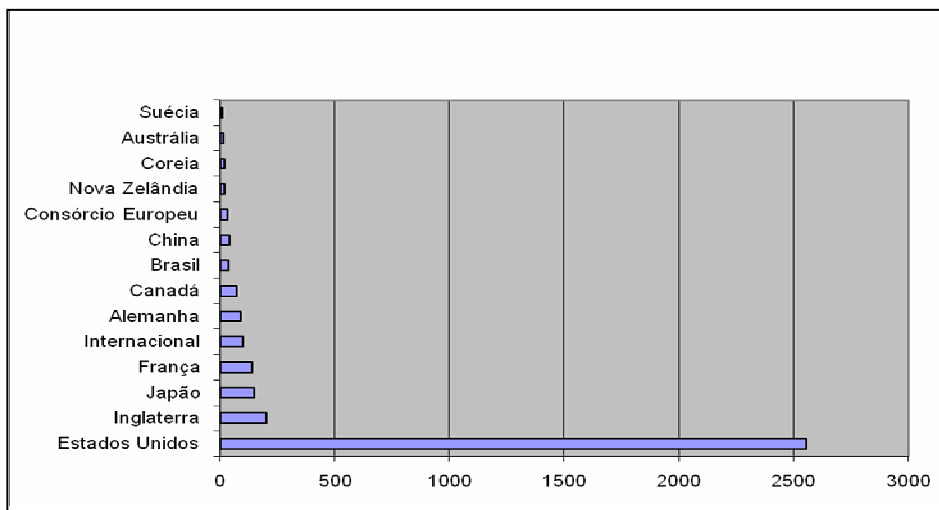


FIGURA 4: Classificação dos países envolvidos em projetos Genomas no período de 2005 a 2008. Adaptado de GOLD (*Genomes Online Databases*). [site acessado em 06/02/2008]

II.3.2. Genomas seqüenciados de *Corynebacterium*

Como anteriormente mencionado, o gênero *Corynebacterium* possui organismos de grande interesse, como *C. diphtheriae*, *C. jeikeium* e *C. pseudotuberculosis*, de grande importância médica e veterinária (DORELLA et al., 2006a). Dada as justificativas e a importância desses organismos, não é surpresa constatar grande interesse pelo seqüenciamento de genomas desse táxon. Até o momento quatro espécies desse grupo já foram seqüenciadas, sendo elas:

- *C. diphtheriae* (número de acesso: NC_002935): Esta espécie é responsável pela difteria, doença razoavelmente controlada no passado graças a programas de imunizações em massa, mas recentemente emergente em alguns pontos da Europa Oriental, devido à seleção de linhagens multi-resistentes (HADFIELD et al., 2000). Possui ainda diversas ilhas de patogenicidade (CERDENO-TÁRRAGA et al., 2003).
- *C. jeikeium* (número de acesso: NC_007164): Bactéria comumente encontrada na flora cutânea humana sendo, entretanto, reconhecida como um importante patógeno em infecções nosocomiais, isto é, infecções adquiridas em hospitais (TAUCH et al., 2005).
- *C. glutamicum* (número de acesso: NC_006958): Essa espécie é amplamente utilizada na produção industrial de aminoácidos, como L-aspartato e L-lisina, destacando-se assim, como organismo de interesse biotecnológico (KALINOWSKI et al., 2003).

- *C. efficiens* (número de acesso: NC_004369) Também utilizada na síntese de aminoácidos, possui a capacidade de crescer a 40°C, o que a torna industrialmente mais viável do que *C. glutamicum* (NISHIO et al., 2003).

O acesso às informações geradas pela montagem dos genomas, fornece uma valiosa ferramenta para o melhor entendimento da organização, ordem gênica e plasticidade do genoma bacteriano de outras espécies do gênero, principalmente de *C. pseudotuberculosis*. Além disso, a proximidade filogenética entre espécies favorece ainda mais análises de comparação gênica e identificação de características peculiares do gênero.

Além dos genomas supracitados, diversos outros membros do grupo CMN também já tiveram o seu genoma seqüenciado ou ainda estão em andamento (tabela 2).

Tabela 2 – Projetos genomas completos e em andamento de bactérias do grupo CMN.

Espécie	Status	Importância	Linhagem	Tamanho do genoma (Mpb)	Porcentagem GC	Referência
<i>Corynebacterium accolens</i>	Em progresso	Possivelmente relacionada com mastite granulomatosa.	ATCC 49725	-	-	BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Em progresso	Produção industrial de realçadores de sabor nucleotídeos de purina como inosina-5'-monofosfato e xantossina-5'-monofosfato.	DSM 20306	-	-	< http://genome.wustl.edu/hgm/display_tables_hgm.cgi?TABLE_TYPE=targeted_genomes >
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	Em progresso	Patógeno humano e animal.	ATCC 700975	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	Em progresso	Patógeno humano e animal.	DSM 44827	2,4	58	Tauch, A (< http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm044827.html >)
<i>Corynebacterium Diphtheriae</i>	Completo	Agente causador da difteria em humanos	NCTC 13129	2,488	53	Cerdeno-Tarraga <i>et al.</i> , 2005
<i>Corynebacterium efficiens</i>	Completo	Produção industrial de glutamato, outros aminoácidos e compostos	YS-314	3,147	63	Nishio <i>et al.</i> , 2003
<i>Corynebacterium efficiens</i>	Em progresso	Produção industrial de glutamato, outros aminoácidos e compostos	-	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium genitalium</i>	Em progresso	Agente causador de uretrites não-gonocócicas em humanos	ATCC 33030	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	Em progresso	Isoladas do trato genito-urinário de porcos e de humanos.	ATCC 51866	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	Em progresso	Isoladas do trato genito-urinário de porcos e de humanos.	ATCC 51867	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Completo	Produção industrial de glutamato, outros aminoácidos e compostos	ATCC 13032	3,309	53	Ikeda <i>et al.</i> , 2003
<i>Corynebacterium Jeikeium</i>	Completo	Comumente presente na pele de humanos, pode ser um importante agente de infecções nosocomiais	K411	2,462	61	Tauch <i>et al.</i> , 2004
<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	Em progresso	Patógeno humano	DSM 44385	2,400	57.5	Tauch, A. (< http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm044385.html >)
<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	Em progresso	Isolada de swab vaginal humano.	-	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	Em progresso	Causa infecção do trato urinário humano.	ATCC 33035	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Em progresso	Causa lindenite caseosa em caprinos, ovinos, eqüinos e seres humanos.	1002	-	47	Azevedo, V. (< http://www.icb.ufmg.br/big/genomecp/ >)
<i>Corynebacterium striatum</i>	Em progresso	Patógeno humano.	-	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >
<i>Corynebacterium sundsvallense</i>	Em progresso	Possivelmente relacionada a doença humana.	-	-	-	Weinstock G (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >

<i>Corynebacterium thermoaminogenes</i>	Em progresso	Importância biotecnológica	FERM9246	-	-	Gojobori T (< http://genamics.com/cgi-bin/genamics/genomes/genomesearch.cgi?field=ID&query=478 >
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	Em progresso	Patógeno do trato urinário	DSM 7109	2,300	64	Tauch, A. (< http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm007109.html >)
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	Em progresso	Patógeno do trato urinário	DSM 7111	2,300	-	Tauch, A. (< http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm007111.html >)
<i>Mycobacterium avium</i>	Em progresso	Agente causador de tuberculose em aves e humanos imunocomprometidos (crianças, idosos e especialmente pacientes portadores de HIV)	104	5,480	68	http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html
<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>	Completo	Agente causador da doença de Johne, também conhecida como paratuberculose, uma severa infecção crônica intestinal. Esta doença afeta ruminantes domésticos e selvagens, tendo sido também reportada em primatas, coelhos e raposas.	k10	4,829	69	Paustian <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Em progresso	patógeno humano; causadora de infecções bronco-pulmonares e respiratórias.	CIP 104536	-	-	Barbe, V. (< http://genamics.com/cgi-bin/genamics/genomes/genomesearch.cgi?field=ID&query=1058 >
<i>Mycobacterium africanum</i>	Em progresso	Principal causador de tuberculose pulmonar, em seres humanos e animais, na África sub-Sahara.	GM041182	4,441	-	Parkhill J. (< http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Myco_bacterium/africanum/ >
<i>Mycobacterium bovis</i>	Completo	Agente causador da tuberculose bovina clássica, podendo causar também doenças em humanos, especialmente após a ingestão de leite contaminado não pasteurizado. Cepa completamente virulenta.	AF2122/97	4,345	65	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/
<i>Mycobacterium bovis</i>	Em progresso	Agente causador da tuberculose bovina clássica, podendo causar também doenças em humanos. Linhagem utilizada para a produção da vacina BCG, provavelmente a mais conhecida das vacinas contra essa doença.	BCG	4,400	57	http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Lqmb/myco-genomics.htm
<i>Mycobacterium canetti</i>	Em progresso	Agente causador de linfadenite em humanos e animais.	CIPT140010059	-	-	Parkhill J < http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Myco_bacterium/canetti/ >
<i>Mycobacterium canetti</i>	Em progresso	Agente causador de linfadenite em humanos e animais.	K116	-	-	http://www.broad.mit.edu/seq/msc/
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Em progresso	Patógeno humano	CIP 104535	-	-	Barbe V. (< http://genamics.com/cgi-bin/genamics/genomes/genomesearch.cgi?field=ID&query=1063 >
<i>Mycobacterium chlorophenicum</i>	Em progresso	Importância biotecnológica	-	-	-	JCVI < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.xsp >
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Esboço	Patógeno humano	ATCC 13950	5,328	67	Dewar, K. (McGill Univ)
<i>Mycobacterium leprae</i>	Completo	Agente causador da hanseníase em humanos.	TN	3,268	57	Fsihi <i>et al.</i> , 1995
<i>Mycobacterium liflandii</i>	Em progresso	Causa doença em anuros.	128FXT	-	-	Stinear, T. (< http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/tbdb/SequencingInfo.html >)

<i>Mycobacterium marinum</i>	Em progresso	Patógeno de animais e humanos; causadora de tuberculose.	DL240490	-	-	Monash Univ
<i>Mycobacterium marinum</i>	Completo	Patógeno de animais e humanos; causadora de tuberculose.	M	6,637	65	Parkhill J (< http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_marinum/ >)
<i>Mycobacterium microti</i>	Em progresso	Causa tuberculose em roedores e tem sido avaliada como vacina para humanos.	OV254	4,300	-	http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_microti/
<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>	Em progresso	Causa doença pulmonar em humanos e em imunodeprimidos.	ATCC BAA-614	-	-	Weinstock G. (BCM-HGSC < http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/microbiome-index.jsp >)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Em progresso	Micobactéria geralmente não-patogênica, capaz de causar lesões em tecidos moles. Isolada inicialmente do esmegma humano.	MC2 155	7,040	57	http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html
<i>Mycobacterium sp.</i>	Em progresso	Agente causador da tuberculose humana.	Spyr1	-	-	Richardson P (Joint Genome Institute Univ of Ioannina)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Completo	Agente causador da tuberculose humana. Altamente contagiosa, capaz de infectar 80% dos contatos sociais do portador.	CDC1551	4,403	65	Fleischmann <i>et al.</i> , 2002
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Completo	Agente causador da tuberculose humana. Ao contrário de alguns isolados, retém toda a sua virulência em modelos animais, sendo susceptível a drogas e passível de manipulação genética	H37Rv	4,411	65	Cole <i>et al.</i> , 1998
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Completo	Agente causador da tuberculose humana. Essa linhagem possui uma grande distribuição e virulência se comparada à outras linhagens.	210	4,447	57	http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40 linhagens em progresso	Causa tuberculose pulmonar em seres humanos, essa linhagem é resistente à rifamicina e isoniazida.	40 linhagens	-	-	http://www.broad.mit.edu/seq/msc/
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Em progresso	Patógeno humano, causadora de úlcera de Buruli.	1615	-	-	Monash Univ (< http://www.monash.edu.au/ >)
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Em progresso	Patógeno humano, causadora de úlcera de Buruli.	-	4,400	-	http://www.genome.clemson.edu/
<i>Nocardia farcinica</i>	Completo	Agente causador da nocardiose, doença que afeta os pulmões, sistema nervoso central e pele de humanos e animais.	IFM 10152	6,021 (Chromosome) 0,184 (Plasmid pNF1) 0,087 (Plasmid pNF2)	67 68	Ishikawa <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhodococcus sp.</i>	Em progresso	Organismo capaz de degradar uma grande variedade de bifenis policlorados, um conhecido poluente químico.	RHA1	9,700	-	http://www.rhodococcus.ca
<i>Rhodococcus equi</i>	Em progresso	Causa Pneumonia em animais	ATCC 33701	-	-	http://www.uoquelph.ca/
<i>Rhodococcus equi</i>	Em progresso	Bactéria Gram-positiva que causa broncopneumonia em cavalos	103S	4,500	68	Parkhill J. (< http://www.sanger.ac.uk/Projects/R_equi/ >)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Em progresso	Importância biotecnológica	RR4	-	-	Fujita N. (< http://www.bio.nite.go.jp/ngac/e/project-e.html >)
<i>Rhodococcus opacus</i>	Em progresso	Importância biotecnológica	B4	-	-	Fujita N. (< http://www.bio.nite.go.jp/ngac/e/project-e.html >)
<i>Rhodococcus sp.</i>	Em progresso	Importância biotecnológica	I24	5,487	-	http://www.integratedgenomics.com/

II.3.3. Genômica comparativa entre espécies do gênero *Corynebacterium*

II.3.3.1. Características gerais

Os organismos deste gênero possuem genomas circulares, contendo em média 3 megabases e conteúdo médio de C+G de 58% podendo ou não possuir plasmídeos. Observam-se ilhas genômicas nos genomas de todas as *Corynebacterium* já seqüenciadas, o que ressalta o grande número de eventos de transferência horizontal de genes em procariotos (DE LA CRUZ et al., 2000).

O conteúdo gênico médio destas *Corynebacterium* por volta de 2.600 genes, e aparentemente existe tendência à perda de genes em espécies patogênicas: *C. diphtheriae* e *C. jeikeium* possuem 2.389 e 2.165 genes, respectivamente; o que contrasta com a maior abundância de genes em *C. glutamicum* e *C. efficiens*, com 3.057 e 2.950, respectivamente (NAKAMURA et al., 2003).

Uma possível explicação para esse fato é a necessidade das espécies não-patogênicas sobreviverem em ambientes bem mais diversos em termos metabólicos e de estresse, sendo necessária uma gama maior de genes para responder satisfatoriamente a esses fatores. Já as bactérias patogênicas vivem em ambientes que proporcionam uma homeostase mais facilmente alcançada, o que possibilita a perda de diversas funções gênicas não utilizadas (NAKAMURA et al., 2003). Um bom exemplo disso é a incapacidade de crescimento de *C. jeikeium* em meios não-suplementados com lipídeos (TAUCH et al., 2004). Após o seqüenciamento do genoma desse microrganismo, verificou-se a perda do gene da síntese de ácidos graxos do tipo I, o que explica satisfatoriamente o fenótipo observado.

Pode-se observar também a presença de diversos fatores de virulência clássicos encontrados nos membros patogênicos já seqüenciados, como, por exemplo, genes responsáveis pela formação de fímbrias, sistemas de aquisição de ferro, sistema de síntese de sideróforos, entre outros (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003).

II.3.3.2. Compartilhamento de genes entre as espécies do gênero

Após o seqüenciamento de *C. jeikeium* por Tauch et al., em 2005, diversas análises referentes ao compartilhamento de genes entre as outras três espécies do

gênero que possuem o genoma já seqüenciado foram realizadas. Essas análises demonstraram que aproximadamente 52% dos genes deste organismo (1.089) possuem prováveis ortólogos nos três outros organismos seqüenciados, podendo ser considerados como a espinha dorsal do gênero.

Além disso, 17% dos genes (367) são compartilhados por um ou dois dos organismos. Análises de sintenia dos possíveis ortólogos revelam também uma estrutura genômica notadamente conservada, com apenas 10 pontos de perda de sintenia, sendo que *C. jeikeium* ainda apresenta aparente rearranjo gênico com algumas inversões.

II.3.4. Estratégias moleculares baseadas na geração de GSSs para a identificação gênica

O NCBI – “*National Center of Biotechnology Information*” criou um banco de dados destinado ao depósito de GSSs. A criação deste banco de GSSs foi muito importante no sentido de aproveitar a grande produção de seqüências produzidas aleatoriamente que podem conter informações valiosas principalmente para a predição gênica. Essas informações são provenientes do seqüenciamento de bibliotecas de plasmídeos, cosmídeos, BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) ou YACs (*Yeast Artificial Chromosome*) (FANCHIN et al., 2002).

As GSSs são similares à ESTs (*Expressed Sequence Tags*). A diferença entre elas é que a GSS é oriunda de DNA genômico e as ESTs são originadas a partir de cDNA proveniente de um mRNA.

A relevância de se utilizar GSSs para a predição gênica é o seu baixo custo e, tratando-se de microrganismos, tais seqüências são muito informativas. Utilizando-as em análises *in silico*, podem-se verificar, através de similaridade com outras seqüências depositadas, possíveis genes ligados ou não à virulência, além de gerar um catálogo de genes que permitem ampliar o conhecimento biológico sobre o organismo estudado.

Dorella et al. (2006b), construíram uma biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis* com insertos em torno de 24,5 a 121 Kb, utilizando BACs como vetores. Foi obtida uma biblioteca de alta qualidade, com aproximadamente 18.000 clones, os quais uma pequena amostra dos mesmos foram analisadas, totalizando em 215 GSSs depositadas no GenBank. A alta qualidade da biblioteca, com baixa

redundância e sem a presença de *background*, aliada ao grande número de clones, pôde então servir de mapa físico na caracterização final do genoma de *C. pseudotuberculosis*.

Outra vantagem do uso das GSSs, é que ela é uma técnica que permite a rápida identificação de genes que podem ser utilizados em análises comparativas entre linhagens diferentes, auxiliando assim, estudos de epidemiologia molecular. Atualmente a técnica de MLST (*Multi Locus Sequence Type*) realiza uma abordagem pangenômica de isolados bacterianos muito próximos filogeneticamente e tenta, então, permitir a identificação de micro eventos de evolução e diferenças sutis entre cada isolado. Isso acontece através de análises de mudanças na seqüência gênica de aproximadamente nove *loci* de escolha, que geralmente são genes *housekeepings*. Porém, esses genes apresentam um alto grau de conservação entre as espécies, o que constitui um ponto negativo da utilização do MLST, pois geralmente não permite a realização de análises comparativas entre linhagens, devido à dificuldade de separar as linhagens por mudanças nas seqüências gênicas escolhidas. Francis Bolt (comunicação pessoal) não encontrou diferenças alélicas entre espécies de *Corynebacterium* utilizando o MLST utilizando oito seqüências de genes *housekeeping*, devido a grande conservação entre os *loci*.

II.3.5. Pangenômica

Até o momento, poucas são as seqüências de *C. pseudotuberculosis* depositadas em bancos de dados, e de acordo com o NCBI, para essa bactéria, existem até o momento aproximadamente 1230 GSSs. Dessa forma pode-se observar que é altamente importante a identificação, categorização de genes, principalmente dos que codificam proteínas-chave envolvidas em processos de patogenicidade e virulência; as quais são potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas.

Atualmente, os laboratórios envolvidos com testes diagnósticos e imunoprofilaxia voltadas para o combate de bactérias patogênicas, estão utilizando uma nova abordagem: a pangenômica. Essa área visa então o seqüenciamento do genoma de inúmeros isolados de um mesmo patógeno para gerar informações para a compreensão de eventos de micro evolução entre as espécies. Porém, não só isso, mas ainda, auxiliado os pesquisadores a decifrar mecanismos de virulência. A comparação de várias linhagens de uma única espécie tem auxiliado na identificação de genes pertencentes a um dado microrganismo, o que pode explicar não só o estudo da diversidade entre as

espécies, mas também, fornecer a oportunidade de usar o conhecimento adquirido das comparações entre linhagens para o desenvolvimento de novas vacinas e uma nova geração de alvos antimicrobianos (MUZZI et al., 2007).

Muzzi et al. (2007) ao realizarem análises comparativas entre o genoma de oito linhagens de *Streptococcus agalactiae* (grupo B *Streptococcus*) representativas da diversidade genética da espécie, afirmaram que, o pangenoma entre elas, apresentava um repertório global pertencente às espécies, ou seja, peculiar do grupo. Em geral, esse repertório pode ser dividido em três partes: o “genoma compartilhado”, os quais incluem genes invariáveis presentes em todos os isolados; o “genoma dispensável”, que compreende genes em algumas, mas não todas as linhagens, e os “genes linhagem-específicos”, os quais estão presentes em apenas um único isolado, como ilustra a figura 5.

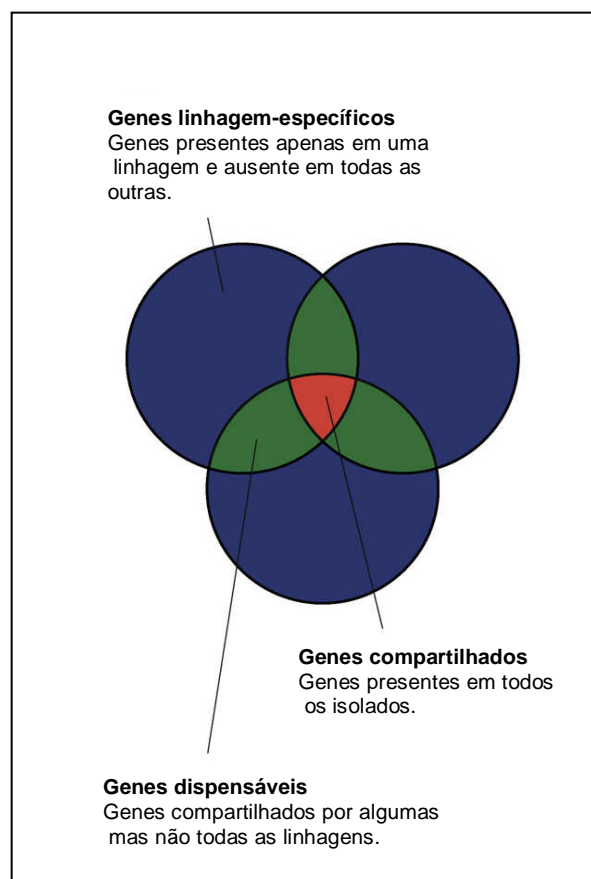


FIGURA 5: Imagem esquemática da estrutura de um pangenoma. Modificado de Muzzi et al., 2007.

Neste contexto, a construção e caracterização de uma biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis* linhagem T2, aliada aos resultados obtidos através do projeto genoma da linhagem 1002 podem favorecer o entendimento de arranjo gênico, plasticidade genômica, como perda, ganho, inversões no genoma, bem como, fornecer informações valiosas de epidemiologia molecular, micro evolução, genes linhagem-específicos e genes comuns entre os isolados. Enfim, contribuem com informações para o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes para o controle da LC.

III OBJETIVOS

III.1. Objetivo geral

Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* da linhagem T2 e caracterização da mesma através de análises de GSS.

III.2. Objetivos específicos

- Construir uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.
- Seqüenciar as extremidades dos insertos da biblioteca genômica.
- Realizar análises *in silico* das seqüências:
 - Analisar similaridade genômica entre *C. pseudotuberculosis* e outras espécies do gênero *Corynebacterium*.
 - Confirmar a sintonia entre *C. pseudotuberculosis* e outras espécies do gênero *Corynebacterium*.
 - Utilizar os dados gerados para inferência de plasticidade genômica entre diferentes linhagens da espécie *C. pseudotuberculosis*.
 - Identificar novos genes.
 - Propor um conjunto de genes para ser utilizado (testado) para o MLST.

IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. ARTIGO

Genome organization and gene content characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Vivian D'Afonseca, Francisco Prosdocimi, Fernanda Alves Dorella, Luis Gustavo Pacheco, Pablo Matias Moraes, Izabella Pena, José Miguel Ortega, Santuza Teixeira, Sérgio Costa Oliveira, Elisângela Monteiro Coser, Luciana Márcia Oliveira, Guilherme Correa Oliveira, Roberto Meyer, Anderson Miyoshi, Vasco Azevedo

Este manuscrito será submetido para publicação em um periódico científico internacional, na área de genômica de microorganismos.

Genome organization and gene content characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Vívian D'Afonseca^a, Francisco Prosdocimi^b, Fernanda A. Dorella^a, Luis Gustavo C. Pacheco^a, Pablo M. Moraes^a, Izabela Pena^b, José Miguel Ortega^b, Santuza Teixeira^c, Sérgio Costa Oliveira^d, Elisângela Monteiro Coser^e, Luciana Márcia Oliveira^e, Guilherme Oliveira^e, Roberto Meyer^f, Anderson Miyoshi^{a**} & Vasco Azevedo^{a*}

^a- Laboratório de Genética Celular e Molecular, Depto. Biologia Geral, ICB-UFMG

^b- Laboratório de Biodados, Depto. Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG

^c- Laboratório de Imunologia e Bioquímica Celular de Parasitas, Depto. Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG

^d- Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Depto. Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG

^e- Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisa Reneé Rachou – FIOCRUZ

^f- Laboratório de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, ICB - UFBA

Vasco Azevedo* and Anderson Miyoshi (share credit in this work for senior authorship)**

vasco@icb.ufmg.br

miyoshi@icb.ufmg.br

Laboratório de Genética Celular e Molecular. Sala Q3-259.

Departamento de Biologia Geral, ICB, UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627 C.P. 486

31.270-010 Belo Horizonte, MG, Brazil

Tel: +55 31 3499-2778

Fax: +55 31 3499-2610

Running Head

Partial-identification of the gene content of *C. pseudotuberculosis*

* To whom correspondence should be addressed

Abbreviations: CLA, Caseous Lymphadenitis; GSS, Genome Survey Sequences; BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; COG, Clusters of Orthologous Groups; *Cd*,

Corynebacterium diphtheriae; Ce, *Corynebacterium efficiens*; Cg, *Corynebacterium glutamicum*; Cj, *Corynebacterium jeikeium*; Cp, *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is an intracellular pathogen that infects sheep and goats. The widespread occurrence and the economic importance of Caseous Lymphadenitis Disease (CLA) have prompted investigation of its pathogenesis. However, the genetic basis of *C. pseudotuberculosis* virulence is still poorly characterized. A genomic library constructed from *C. pseudotuberculosis* was used for the generation of 1440 Genomic Survey Sequences (GSSs), which were submitted to *in silico* analysis using bioinformatics tools and public databases for comparative analyses. Non-redundant unique sequences were used as a query for BLAST searches against the genome, translated genome and proteome of four other complete-genome *Corynebacterium* species. We were able to characterize approximately 8% of the genome of *C. pseudotuberculosis*, along with not-previously-described functional group genes, based on the COG database, which the GSSs classification in categories resulted: 13% in Information Storage and Processing, 14% in Cellular Process and 23% in Metabolism. We found a close relation between *C. pseudotuberculosis* and *C. diphtheriae* conserved genes synteny in *Corynebacteria* species.

Keywords: *Corynebacterium* genus, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Genome Survey Sequence (GSS), microbial genome sequencing, comparative genomics.

INTRODUCTION

The decade of 1990 was the starting point of the genomic era, with the sequencing of the first microbial genome, a free-living organism - the bacterium *Haemophilus influenzae* [1,2]. Since then, genomic research has generated considerable information, which is available in public databases [3]. This information has helped scientists discover genes and their functionality, and consequently proteins that they encode, by comparing genomes of evolutionary related species [4]. Although prokaryotic microorganisms account for the greatest proportion of the planet's total biomass [5] much more still needs to be understood about them. Thus, the massive accumulation of prokaryotic DNA sequences generated by microbial genome projects can provide great advances in our understanding in various fields, including bacterial diversity, mobile genetic elements (MGE) and horizontal gene transfer (HGT) [6]. Furthermore, genome sequencing has provided important insights concerning deduced genes and proteins of pathogens, including biological features, putative virulence factors and potential targets that might be useful for the development of immunological or chemotherapeutic reagents against specific organisms [4,7]. At present, around 570 microbial genome projects are already finished and published, and there are more than 1,100 active sequencing projects (Genomes OnLine Database, <http://www.genomesonline.org/>).

The *Corynebacterium* genus consists of a large number of Gram-positive bacteria that are pleiomorphic, asporogenous and possess high G + C content in their genomes [8]. Originally, the genus *Corynebacterium* had only diphtheria bacilli and some other animal-pathogenic species [9,10]. Later, other microorganisms were added, including plant and animal pathogens, nonpathogenic soil bacteria and saprophytic species [10-12]. Members of the genus *Corynebacterium* are closely related to *Mycobacterium* species, and both are classified in the taxonomic order Actinomycetales [13]. At present, the National Center for Biotechnology Information (NCBI) genomes database contains the complete genome of four different species of the *Corynebacterium* genus: *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Corynebacterium jeikeium* [14-17].

One of the most important members of this genus, and the focus of this paper, is the bacterium *C. pseudotuberculosis*, a facultative intracellular pathogen that infects sheep and goats, causing caseous lymphadenitis (CLA). Occasionally human infections are also diagnosed. This disease is spread worldwide, and its considerable economic importance has prompted investigation of its pathogenesis. However, the genetic

determinants of *C. pseudotuberculosis* virulence are still poorly characterized [3]. Furthermore, this species has only 19 proteins identified in the GenPept database. In this context, the partial *C. pseudotuberculosis* genome sequence analysis that we provide in this work may help improve our understanding of the molecular and genetic basis of this bacterium's virulence, and also may be useful for the development of novel diagnostic methods and vaccines, contributing to the control of CLA.

METHODOLOGY

Bacterial strains and growth conditions

Corynebacterium pseudotuberculosis wild-type strain T2 was isolated from a caseous granuloma found in a CLA-affected goat in Bahia state (Brazil) and identified with the API CORYNE battery bacterial identification diagnostic kit (Biomérieux, France). This bacterium was aerobically grown in Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia) broth at 37°C under agitation [18]. To obtain recombinant clones, we used the DH5 α strain of *Escherichia coli*, aerobically grown at 37°C in Luria Bertani medium (LB, Difco Laboratories, Detroit, USA), supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and X-Gal (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Genomic DNA extraction and construction of a genomic library

Genomic DNA extraction was performed according to a previously-described protocol [19]. DNA integrity was confirmed through electrophoresis in 0.8% agarose gels and visualization with ethidium bromide staining. We used spectrophotometer analysis to evaluate the DNA and to test its quality. Total genomic DNA was submitted to two minutes of nebulization to obtain differently-sized *C. pseudotuberculosis* DNA fragments [20].

Fragmentation was confirmed by electrophoresis in 0.8% agarose gels and DNA fragments ranging from 500 – 1000 bp were obtained. These fragments were cloned in the PCR[®]4 Blunt-TOPO vector using the TOPO[®] Shotgun Subcloning KIT (Invitrogen) and transformed into *E. coli* DH5 α by electroporation [21]. Blue-white screening was performed to select for positive clones, and PCR with M13 universal primers was used to confirm insert presence (TOPO[®] Shotgun Subcloning KIT (Invitrogen)).

GSS sequencing

Plasmid extraction was performed directly on plates using a standardized protocol [22]. The plasmids that were obtained were analyzed in 0.8% agarose gels and the

concentrations were determined spectrophotometrically. The plasmid DNA, around 200 ng μL^{-1} , was submitted to sequencing reactions in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf), using a DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare) and universal primers M13 F and M13 R, according to manufacturer's instructions. Sequences were generated in a MegaBACE™ 1000 apparatus (GE Healthcare).

GSS amplification by PCR

For confirmation of the presence of putative exclusive gene in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and to exclude contamination, we designed forward and reverse primers for each genes that did not have any similarities in the search databases of other sequenced *Corynebacterium* spp:

Putative Oligopeptide/dipeptide ABC transporter primers:

Forward: 5'-CCTTACCGAGACAACGTCAT-3'

Reverse: 5'-GCCTGGTGCTTATCATTGAT-3'

NADP oxidoreductase, coenzyme F420-dependent primers:

Forward: 5'-CTGCGACATAGCTAGGCACT-3'

Reverse: 5'-CCGCCAGACTTTTCTCTACA-3'

Proline iminopeptidase (PIP) primers:

Forward: 5'-AACTGCGGCTTTCTTTATTC-3'

Reverse: 5'-GACAAGTGGGAACGGTATCT-3'.

Saccharomyces cerevisiae 60S ribosomal subunit primers:

Forward: 5' ATTCTTAACGGGAAGTGACG 3'

Reverse: 5' AAGTTGATTCCTTTTCCGG 3'

Generated amplicons with lengths of: 285 bp, 382 bp, 551 bp e 462bp respectively.

Base-calling, sequence filtering and clustering

Base-calling was performed using the PHRED algorithm [23-24] with *trim_alt* and *trim_cutoff* parameters set at 0.16, as suggested by Prosdocimi et al. [25].

In order to filter sequences for low quality and vector contamination, we used the algorithms SeqClean (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/>) and PHRAP's package *cross_match* (<http://www.phrap.org>). SeqClean was first used to remove low quality from PHRED base-called sequences. Then the *cross_match* algorithm was run against the sequence of the cloning vector used in this analysis; finally, SeqClean was run again to remove the *cross_match*. Sequence clustering was performed using TIGR software TGICL [26], with default parameters.

Comparative BLAST analysis against Corynebacterium complete genomes

Non-redundant unique sequences clustered with TGICL were used as a query for BLAST searches [27], against other species of the *Corynebacterium* genus, to look for similarities between these species and *C. pseudotuberculosis*. We ran BLASTs on the DNA (BLASTn) and the protein levels (BLASTx, tBLASTx) to look for nucleotide and amino acid conservation among species.

These complete genomes are available in the NCBI site and their accession numbers are: *C. diphtheriae* (NC_002935); *C. efficiens* (NC_004369); *C. glutamicum* (NC_006958) and *C. jeikeium* (NC_007164)

COG functional categories inference through Blast best-hit analysis

Unique sequences from *C. pseudotuberculosis* were also used as query for BLASTx searches in the COG database [28]. The NCBI COG database clusters genes from 66 microbial species into orthologous groups and classifies the corresponding protein clusters into biological process categories. We used a best-hit inference approach to classify this organism's sequences into COG-functional categories [28]. The BLASTx algorithm was run using a $10e^{-5}$ cut-off value, and *C. pseudotuberculosis* partial genome sequences were classified into COG categories based on the best-hit match of each sequence against COG-classified proteins.

Comparative BLAST analyses of the UNIPROT database

The most recent version of the UNIPROT curated protein database at the time (Feb 13, 2007) [29,30] was downloaded from the EBI website (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/uniprot/knowledgebase/uniprot_sprot.fasta.gz). UNIPROT was used as a database subject for BLASTx searches using *C. pseudotuberculosis* unique sequences as a query. The number of protein hits was recorded, as well as the number of unique sequences matching UNIPROT proteins and not *Corynebacterium*-genus or COG proteins.

Gene synteny analysis with Corynebacterium genomes

Synteny analysis of *C. pseudotuberculosis* non-redundant GSSs was also performed to determine if the gene order is conserved in *C. pseudotuberculosis* compared to other *Corynebacterium* species. Using tBLASTx best-hits data of *C. pseudotuberculosis* unique sequences against *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum* and *C. jeikeium* genomes, we calculated the putative average position of each protein-coding gene (subject end minus subject init), compared to other *Corynebacterium* spp. complete

genomes. The putative gene position results were plotted and ordered based on *C. diphtheriae* hits.

Raw data filtering ,processing and Clustering analysis

Base called sequences were first filtered to remove vector regions, short (<100 bp) and low quality regions. Filtering removed more than 30% of the bases and sequences. Larger sequences were also reduced due to vector regions and/or low quality contamination.

C. pseudotuberculosis GSS were clustered using TIGR TGICL software. This software uses Megablast [31] to cluster sequences and CAP3 [32] to further assemble the sequences from each cluster. As expected, we observed a large number of singlets and clusters with a small number of sequences, demonstrating the quality of the library (Fig. 1). The 466 non-redundant unique sequences span approximately 184,000 bases (Table 1).

BLAST against complete genome of Corynebacterium species

Using the data given above, all the analyses were made using the non-redundant set of *C. pseudotuberculosis* sequences (uniques). *C. pseudotuberculosis* GSS unique sequences were then used as a query for BLAST searches against the genome (BLASTn), the translated genome (tBLASTx) and the proteome (BLASTx) of other *Corynebacterium* species complete-genome (Table 2).

RESULTS

Were obtained about 1,440 GSS and after sequence processing, resulted in about 1,000 sequences. In present work were used all GSS's biggest that 100bp presenting average weight of 360bp. The longest sequence presents weight of 792bp that resulted in 346,869 residues generated.

As expected, *C. pseudotuberculosis* is more similar to other *Corynebacterium* spp. at the protein level than at the DNA level [13]. Based on BLAST analysis of *C. pseudotuberculosis* uniques against other *Corynebacterium* species (Table 2), *C. pseudotuberculosis* is most similar to *C. diphtheriae*, followed by *C. glutamicum*, *C. efficiens* and *C. jeikeium*. These results also were previously reported by Khamis [33], which using *rpoB* and 16S rRNA analysis suggested these phylogenetic relations.

All GSS unique sequences were used as a query for BLASTx searches of the COG database. We used a 10^{-5} BLAST e-value cut-off, and the *C. pseudotuberculosis*

translated partial protein sequences were classified into functional categories based on the category of their best hit in the COG database. Therefore, *C. pseudotuberculosis* proteins were classified into major (Fig. 2) and minor (Table 3) COG-functional categories.

Almost half of the *C. pseudotuberculosis* GSS uniques did not hit to any protein in the COG database, even with the low weakly-stringent BLAST cut-off that we used. We found metabolism to be the category within which most of genes were classified; Information Storage and Processing, Cellular Processes and Poorly Characterized all had about the same percentage of genes classified (~10%, Fig. 2). To put these percentages into perspective, we calculated the expected percentage of genes classified in *Corynebacterium*, based on the COG classification of the four bacteria of this genus whose complete genome had already been sequenced (Table 3).

Most GSS uniques classified data fits the expected percentage of classification into the *Corynebacterium* genus if we consider this is only a partial analysis of *C. pseudotuberculosis* genome and proteome (Table 3). We found an excess of not-classified sequences (see also Fig. 2).

Shared hits against different databases

In order to search for putative *C. pseudotuberculosis* genes originated by lateral transfer, we compared BLAST results against various databases. It was expected that most of *C. pseudotuberculosis* genes derived from GSS would be found in other *Corynebacterium* species if they had been present in the common ancestor of all species in this genus. This expectation was confirmed (Fig. 3). However, we observed four putative *C. pseudotuberculosis* proteins (translated uniques) that had similarities to COG and UNIPROT proteins but without similarities to other *Corynebacterium* species proteins. Therefore, we consider these four proteins to be putative candidates for analysis of lateral transfer into the *C. pseudotuberculosis* genome.

The putative genes that might have become established in the *C. pseudotuberculosis* genome by lateral transfer were identified as: (1) an oligopeptide/dipeptide ABC transporter, an ATPase subunit with best hit in the NR database against another bacteria (*Arthrobacter* sp. FB24) from the same order as *C. pseudotuberculosis* (Actinomycetales) (e-value $2e^{-19}$); (2) an NADP oxidoreductase, an F420-dependent coenzyme from *Chloroflexus aurantiacus*, a bacterium in the Chloroflexi phylum (e-value $4e^{-10}$); (3) a proline iminopeptidase (PIP) from *Xanthomonas axonopodis* of the Proteobacteria phylum (e-value $1e^{-55}$); and (4) a high-similarity (99% identity) to the complete sequence of a ribosomal protein, L30, of the large (60S) ribosomal subunit of baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (e-value $2e^{-61}$).

Confirmation of the putative genes of *C. pseudotuberculosis*

By PCR analysis, we found three putative exclusive genes of *C. pseudotuberculosis*. For this amplification, we used genomic DNA of 1002 and T2 strains of *C. pseudotuberculosis*, along with *C. pseudotuberculosis equi*, *C. ulcerans*, *C. renale*, which has not yet been sequenced, *C. diphtheriae* and *C. jeikeium*. As a negative control, we used the vector TOPO alone and as positive control, we used the clone that contained the fragment that originated the GSS (Fig. 4).

For contamination exclusion was also done PCR analysis of the of the large (60S) ribosomal subunit of baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (data not shown), which not amplified of *C. pseudotuberculosis* genome and occurred the amplification in positive control (*S. cerevisiae* DNA), suggesting the contamination.

Gene order analysis

In order to determine whether gene order is conserved in *Corynebacterium* species, in comparison with the *C. pseudotuberculosis* partial genome analysis that we had made, we used tBLASTx best-hit results against *C. diphtheriae*, *C. glutamicum*, *C. efficiens* and *C. jeikeium* genomes to define the position where all the GSS *C. pseudotuberculosis* putative genes have been mapped in those genomes.

All of the *C. pseudotuberculosis* GSS putative genes were mapped against other *Corynebacterium* genomes (Fig. 5), ordered by the *C. diphtheriae* genome. All the genomes were found to have a high degree of gene order conservation when the *C. pseudotuberculosis* GSSs were used for mapping *C. jeikeium* had a clear inversion in the exact center of its genome when compared to others. Moreover, the symbols representing the *C. efficiens* and *C. glutamicum* genomes were often seen together, showing the similarity between these genomes. We did not see any evidence of similarity between *C. pseudotuberculosis* and *C. diphtheriae* genes outside of the main diagonal line, suggesting considerable conservation of gene order in these two species.

DISCUSSION

We have analysed the *C. pseudotuberculosis* genome based on ~1,000 genome-survey sequences. DNA clustering of these data produced 466 sequences, involving 183,692 base pairs in this organism's genome. Another four *Corynebacterium* species from this same genus had already been sequenced and their genomes varied from 2.4 to 3.2 megabases.

We analyzed between 5.6 to 7.5% of the *C. pseudotuberculosis* genome. Since we found *C. pseudotuberculosis* to be most similar to *C. diphtheriae*, a species with a 2.4 megabase genome, at both the nucleotidic and the amino-acid levels (Table 3), we probably analyzed closer to 7.5% of the *C. pseudotuberculosis* genome.

We performed many similarity analyses, comparing *C. pseudotuberculosis* GSS genome data with the genomes and proteomes of four other *Corynebacterium* species that already have been completely sequenced. Similarity was greatest at the protein level. This may indicate that these species diverged evolutionarily a long time ago. This also may be due to random, neutral mutations that did not affect the phenotype. We found *C. pseudotuberculosis* to have more nucleotide and amino acid similarities with *C. diphtheriae* than with other species (Table 3). We found that after *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis* was most similar to *C. efficiens* and *C. glutamicum*. In contrast, *C. jeikeium* was most distant from the *C. efficiens* and *C. glutamicum*. Khamis [33] found the same species relationships based on 16S rRNA and *rpoB* data.

After the GSS's clusterization was found an interesting cluster that present 25 sequences. Similarities analyses showed this contig have similarity to subunit 23S rRNA of *C. diphtheriae* gravis NCTC13129, present 96% of identities and e-value of 0.0 (Fig.1). The very high number of "no hits" seen in Fig. 2 can be almost totally explained by considering both the size of the non-coding regions in the *Corynebacterium* genomes. A third of the genes of *C. pseudotuberculosis* were not classified into COG categories of the other species in the *Corynebacterium* genus (Table 3). Also, we found that 40.6% of the non-redundant unique sequences of *C. pseudotuberculosis* fell into this non-classified category.

However, the figure of one third of the genes (Table 3) only indicates the percentage of genes not classified as COGs, while the unique sequences include both genes and intergenic regions. We found that the proportions of the genomes of *C. diphtheriae*, *C. glutamicum*, *C. efficiens* and *C. jeikeium* that were composed of non protein-coding regions were 11.7, 6.7, 12.7 and 8.4%, respectively. Therefore, if we consider an average putative value of 9.9% for *C. pseudotuberculosis* genome non-coding regions, plus 33.3% putative *C. pseudotuberculosis* proteins not classified as COGs, we obtain a value of 43.2% uniques that are expected not to be not classified as COGs; this number is close to the numbers seen in Fig. 2 (40.6%).

Comparing the number of uniques found as BLAST hits against *Corynebacterium* proteins that have significant similarities with proteins in two different curated protein databases (COG and UNIPROT), we found three *C. pseudotuberculosis* genes that could

have been incorporated through lateral gene transference. Among the four genes found in this category, a proline iminopeptidase (PIP) and a ribosomal protein had high similarity indexes with other species proteins. Presence of the three GSS was confirmed by PCR in *C. pseudotuberculosis* (Fig. 4), suggesting that PIP, putative oligopeptide/dipeptide ABC transporter and NADP oxireductase actually are present in the genome of *C. pseudotuberculosis*. Furthermore, it is also present in *C. ulcerans* (putative dipeptide/oligopeptide ABC transporter), *C. renale* (all three GSS) and not present in *C. diphtheriae* and *C. jeikeium*, as we report here. The presence of these genes in *C. pseudotuberculosis* as well as *C. renale* and *C. ulcerans* can be explained as previously reported by Dorella et al [34] which based on analysis of the *rpoB* gene, suggested a strong relationship between *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans*.

We also evaluated the synteny of *C. pseudotuberculosis* putative genes and genes from other *Corynebacterium* genomes (Fig. 5). An almost straight line was seen when *C. pseudotuberculosis* putative gene positions were mapped against the *C. diphtheriae* genome this finding demonstrated that our analysis was efficient in this sample of randomly-located genes in the *C. pseudotuberculosis* genome, and also attesting to the quality of our genomic library. A broken line would indicate that some regions had been preferentially sampled. Moreover, all the *C. pseudotuberculosis* GSS uniques, examining the main diagonals in Fig. 5, could probably be used as anchors to produce a final version of a future *C. pseudotuberculosis* genome initiative.

Many *C. pseudotuberculosis* genes mapped in different positions when compared to *C. efficiens* and *C. glutamicum* genomes. Nevertheless, we found many filled and not-filled triangles in similar positions (off the diagonal), also evidencing similarity between *C. efficiens* and *C. glutamicum* genomes and differences compared to *C. diphtheriae* and *C. pseudotuberculosis*. *C. jeikeium* genome was found to be, as expected, the most divergent species based on gene order. Synteny analysis suggests that *Corynebacteria* has rarely undergone genome rearrangements and has maintained ancestral genome structures, even after the divergence of *Corynebacteria* and *Mycobacteria* [13].

Thus, based on our analysis of ~1,000 *C. pseudotuberculosis* GSS sequences, we produced an overview of this bacterium's genome. The sequence of ~8% of its genome allowed us to determine its evolutionary position among other *Corynebacterium* spp. for which we have the complete genome, and to classify putative proteins into COG functional Categories. The results indicate that the library constructed will be useful in future whole genome shotgun sequencing efforts.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work received funding from FAPEMIG REDE-2829/05.

REFERENCES

- [1] R.D. Fleischmann, et al., Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*, *Science* 269 (1995) 496-512.
- [2] M. Mora, C. Donati, D. Medini, A. Covacci & R. Rappuoli, Microbial genomes and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach, *Current Opinion in Microbiology* 9 (2006) 532-536.
- [3] F.A. Dorella, et al., Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing, *Genet. Mol. Res.* 5 (2006) 653-663.
- [4] P.B.S. Celestino, et al., Update of microbial genome programs for bacteria and archaea, *Genet. Mol. Res.* 3 (2004) 421-431.
- [5] F. Rodríguez-Valera, Environmental genomics, the big picture?, *FEMS Microbiol. Lett.* 231 (2004) 153-158.
- [6] T.T. Binnewies, et al., Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries, *Funct. Integr. Genomic* 6 (2006) 165–185.
- [7] A. Tauch, E. Trost, T. Bekel, A. Goesmann, U. Ludwig & A. Pühler, Ultrafast *De Novo* Sequencing of *Corynebacterium urealyticum* Using the Genome Sequencer 20 System, *Biochemica* 4 (2006) 1-4.
- [8] J. K. Deb & N. Nath, Plasmids of *corynebacteria*, *FEMS Microbiology Letters* 175 (1999) 11-20.
- [9] L. Barksdale, *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives, *Bacteriol. Rev.* 34 (1970) 378-422.
- [10] C. Pascual, P.A. Lawson, J.A.E. Farrow, M.N. Gimenez & M. Collins, Phylogenetic Analysis of the Genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences, *International Journal of Systematic Bacteriology* 1 (1995) 724–728.
- [11] M.D. Collins & J.F. Bradbury, Plant pathogenic species of *Corynebacterium*, *Bergey's manual of systematic Bacteriology* 2 (1986) 276–1283.
- [12] M.D. Collins & C.S. Cummins, Genus *Corynebacterium*, *Bergey's manual of systematic Bacteriology* 2 (1986) 1266–1276.
- [13] Y. Nakamura, Y. Nishio, K. Ikeo, T. Gojobori, The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system, *Gene* 317 (2003) 149–155.

- [14] A.M. Cerdeno-Tarraga, et al., The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129, *Nucleic. Acids Research* 31(2003) 6516-6523.
- [15] M. Ikeda & S. Nakagawa, The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 99-109.
- [16] K. Matsui, et al., Comparative Complete Genome Sequence Analysis of the Amino Acid Replacements Responsible for the Thermostability of *Corynebacterium efficiens*, *Genome Research* 13 (2003) 1572-1579.
- [17] A. Tauch, et al., Complete Genome Sequence and Analysis of the Multiresistant Nosocomial Pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a Lipid-Requiring Bacterium of the Human Skin Flora, *Journal of Bacteriology* 13 (2005) 4671–4682.
- [18] F.A. Dorella, et al., An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Veterinary Microbiology* 114 (2006) 298-303.
- [19] L.G.C. Pacheco LGC, et al., Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples, *Journal of Medical Microbiology* 56 (2007) 1-7.
- [20] B.A. Roe, J.S. Crabtree, A.S. Khan, DNA isolation and sequencing, New York, N.Y: John Wiley & Sons (1996).
- [21] W.J. Dower, J.F. Miller & C.W. Ragsdale, High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Molecular Biology Group, Bio-Rad Laboratories, Richmond, *Nucleic. Acids. Res.* 16 (1988) 6127–6145.
- [22] J. Sambrook, E.F. Fritsch & T. Maniatis T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- [23] B. Ewing & P. Green, Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, *Genome Res* 8 (1998) 186-94.
- [24] B. Ewing, L. Hillier, M.C. Wen, P. Green, Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, *Genome Res.* 8 (1998) 175-85.
- [25] F. Prosdocimi, D.A.O. Lopes, F.C. Peixoto, J. M. Ortega, Effects of sample re-sequencing and trimming on the quality and size of assembled consensus, *Genet. Mol. Res.* (2007) (In press).
- [26] G. Pertea, et al., TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets, *Bioinformatics* 19 (2003) 651-2.
- [27] S.F. Altschul et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic. Acids. Res.* 1 (1997) 3389-402.
- [28] R.L. Tatusov, E.V. Koonin, D.J Lipman, A genomic perspective on protein families, *Science* 278 (1997) 631-637.

- [29] R. Apweiler, et al., UniProt: the Universal Protein knowledgebase, *Nucleic. Acids. Res.* 1 (2004) 115-119.
- [30] UniProt Consortium, The Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic. Acids. Res.* 35 (2007) 193-197.
- [31] Z. Zhang, S. Schwartz, L. Wagner, W. Miller, A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J. Comput. Biol.* 7 (2000) 203-14.
- [32] X. Huang & A. Madan, CAP3: A DNA sequence assembly program, *Genome Res.* 9 (1999) 868-77.
- [33] A. Khamis, D. Raoult, B. La Scola, *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 3925-31.
- [34] F.A. Dorella, L.G.C. Pacheco, S.C. Oliveira, A. Miyoshi & V. Azevedo, *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence, *Veterinary Research* 37 (2006) 1-18.

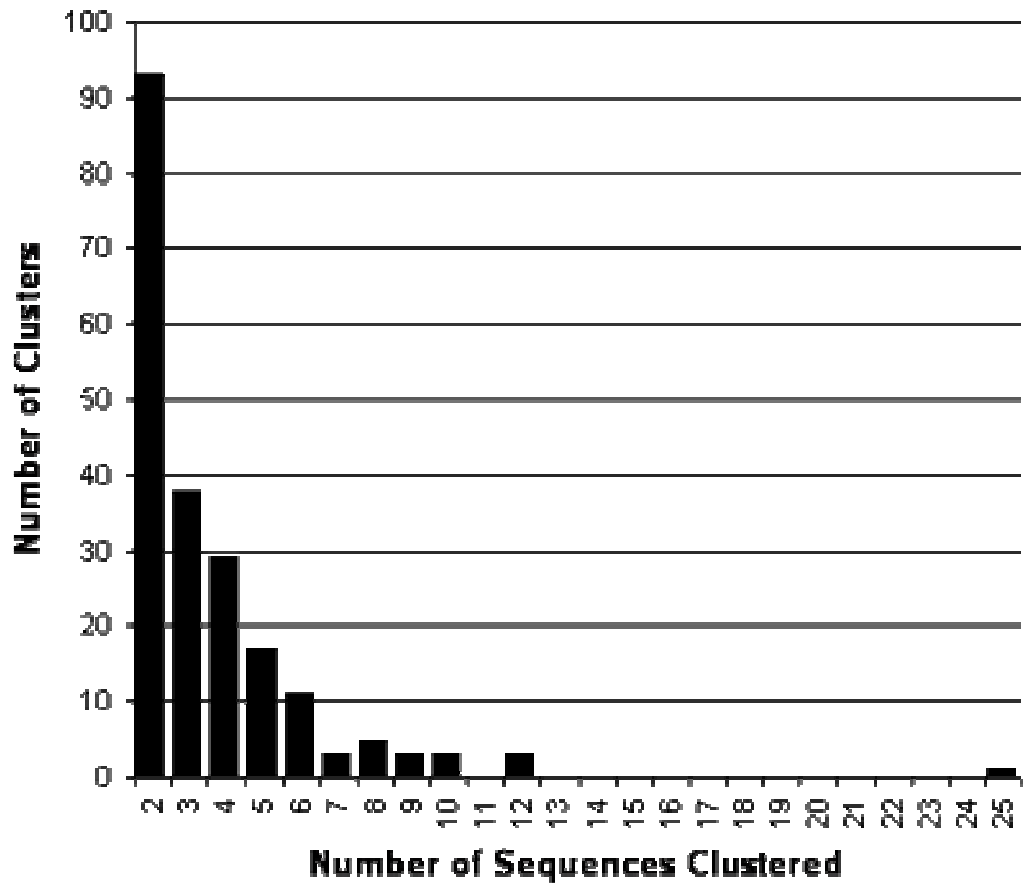


Fig. 1. Number of clusters by class of clustered sequences, as defined by TGICL/Megablast.

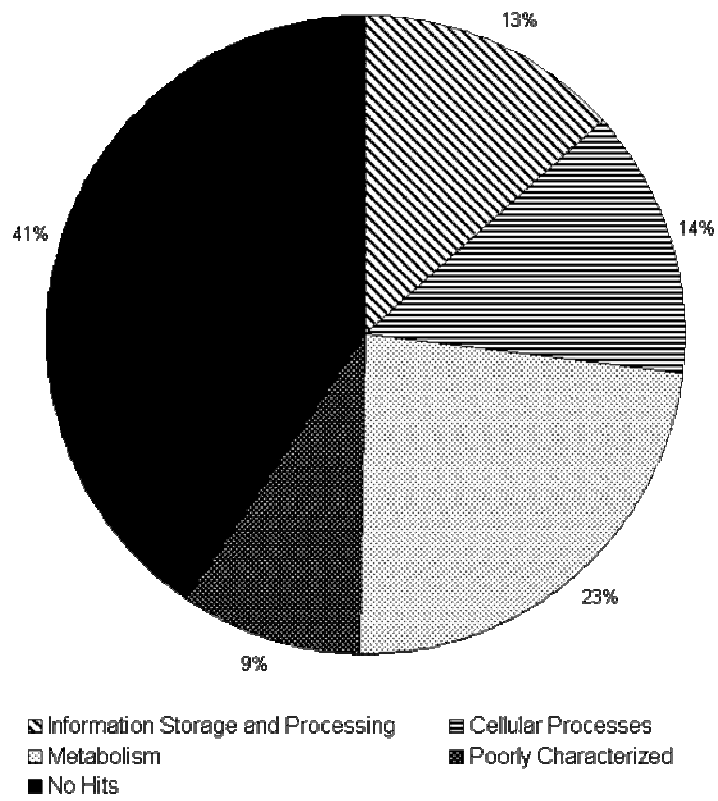


Fig. 2. GSS classification into major COG categories.

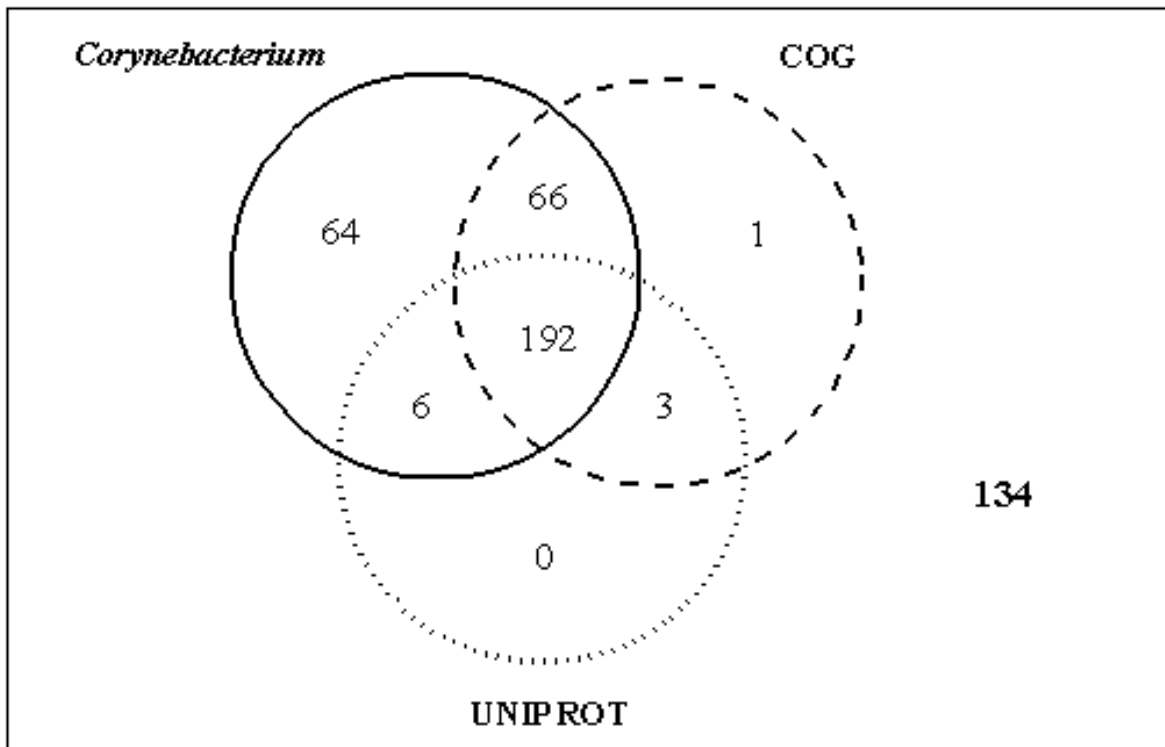
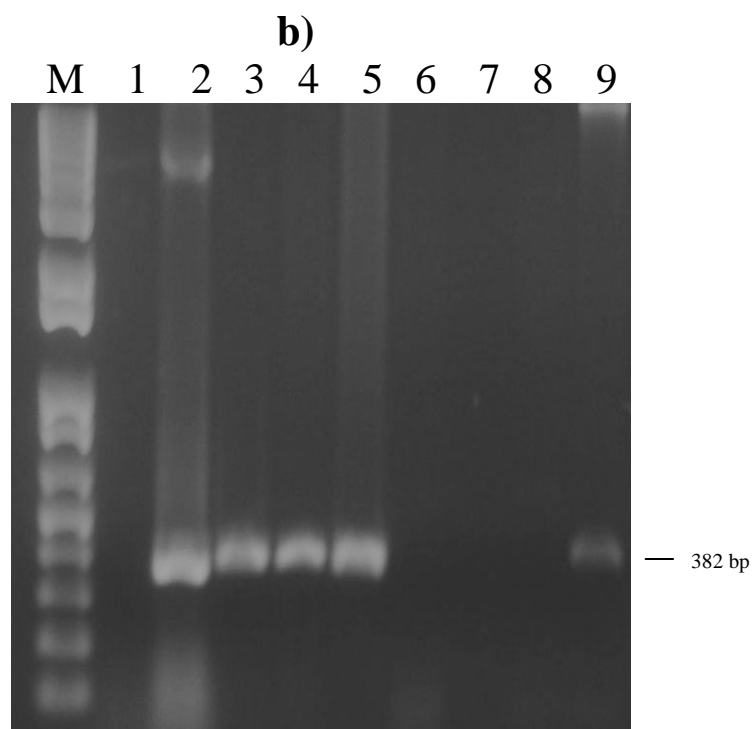
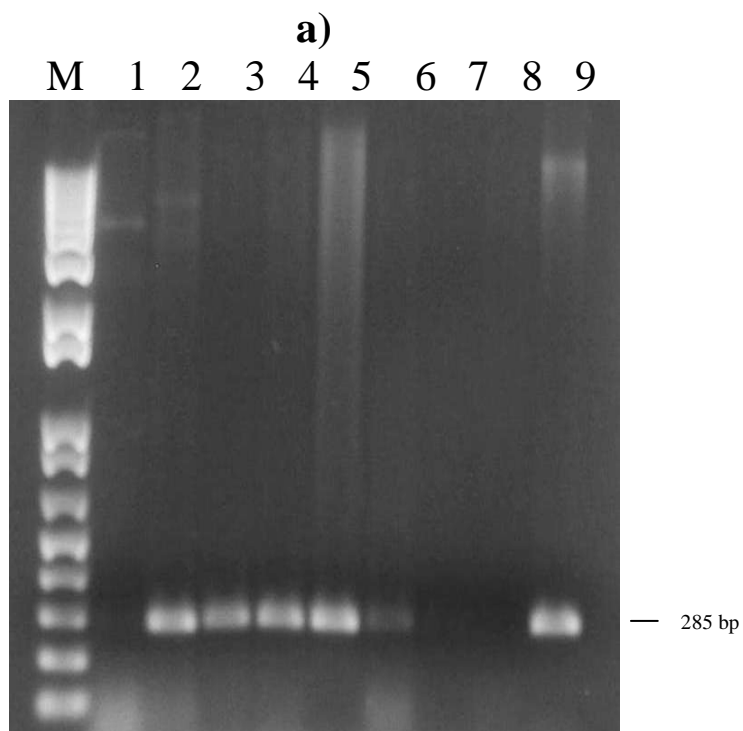


Fig. 3. Distribution of *Corynebacterium pseudotuberculosis* GSS uniques' BLAST hits against three databases: COG, UNIPROT and a built-in *Corynebacterium* protein database containing the proteomes.



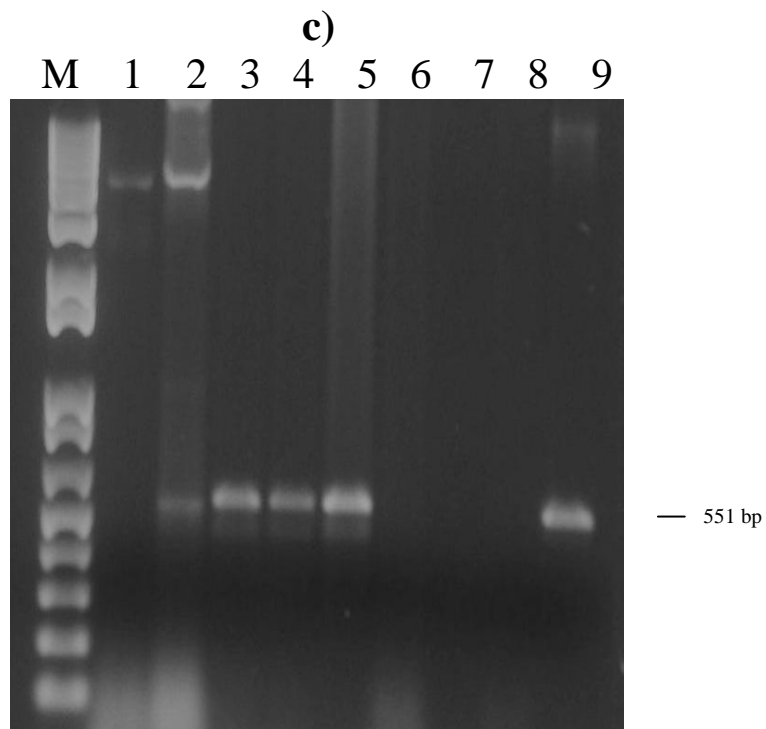


Fig. 4: PCR confirmation of the presence of the putative genes in *C. pseudotuberculosis*. (A) putative dipeptide/oligopeptide ABC transporter. (B) NADP oxidoreductase. (C) PIP – proline iminopeptidase. (M) Molecular marker (1Kb Ladder Plus); (1) Negative control; (2) Positive control; (3) *C. pseudotuberculosis* 1002; (4) *C. pseudotuberculosis* T2; (5) *C. renale*; (6) *C. ulcerans*; (7) *C. diphtheriae*; (8) *C. jeikeium*; and (9) *C. pseudotuberculosis equi*.

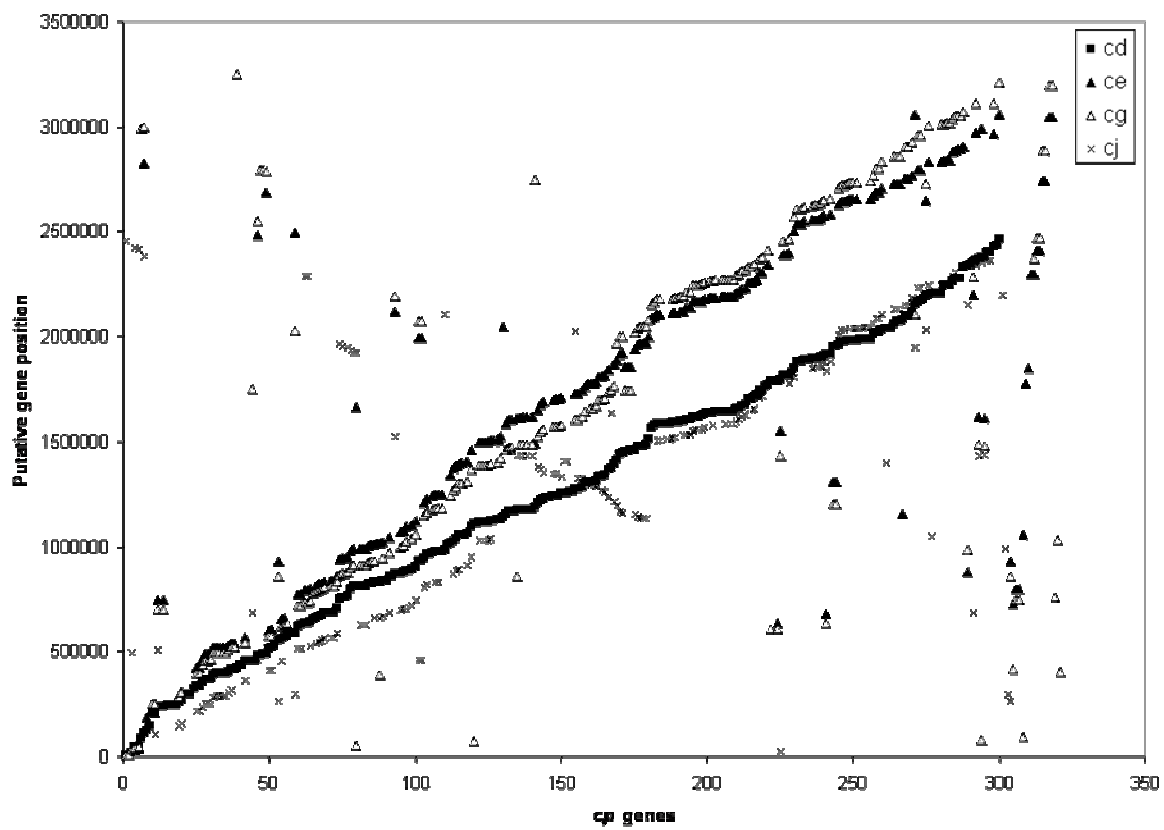


Fig. 5: Gene synteny analysis of *C. pseudotuberculosis* GSS uniques based on tBLASTx genome mapping against other *Corynebacterium* genomes.

Sequence Class	Number of bases	Number of Sequences	Average Size (bp)	Longest Sequence	Shortest Sequence
Singlets	91,047	276	331	792	100
Sequences clustered	255,813	687	372	786	100
Clusters	92,645	190	490	1248	121
GSS Uniques* (non-redundant set)	183,692	466	395	1248	100

Table 1. Clustering results.

* Unique data (except for longest and shortest sequences) are the sum of singlets plus clusters data.

BLAST program	Subject	E-value cutoff	<i>cd</i> ^{*a}	<i>ce</i> ^{*a}	<i>cg</i> ^{*a}	<i>cj</i> ^{*a}
tBLASTx	Genome	10 ⁻¹⁰	300 (100%)	244 (100%)	247 (100%)	198 (100%)
BLASTn	Genome	10 ⁻¹⁰	106 (35%)	42 (17%)	46 (19%)	31 (16%)
BLASTx	Proteome	10 ⁻¹⁰	268 (89%)	224 (92%)	221 (90%)	182 (92%)
BLASTx	Proteome	10 ⁻⁵	305	274	275	235

Table 2. BLAST analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* uniques against other *Corynebacterium* species.

* Number of *C. pseudotuberculosis* uniques hits against other species' genomes;

^aPercentage of searches with Genome and tBLASTx; *cd*: *Corynebacterium diphtheriae*, *ce*: *Corynebacterium efficiens*; *cg*: *Corynebacterium glutamicum*; *cj*: *Corynebacterium jeikeium*.

COG Category	Cat*	Cp**	% in genus***
(J) Translation, ribosomal structure and biogenesis	Inf	21 (4.2%)	3.9
(K) Transcription	Inf	23 (4.6%)	5.4
(L) DNA replication, recombination and repair	Inf	23 (4.6%)	5.2
(D) Cell division and chromosome partitioning	pCel	1 (0.2%)	0.5
(O) Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	pCel	8(1.6%)	2.2
(M) Cell envelope biogenesis, outer membrane	pCel	19 (3.8%)	3.1
(N) Cell motility and secretion	pCel	0	0.0
(U) Intracellular trafficking and secretion	pCel	1 (0.2%)	0.7
(V) Defense mechanisms	pCel	8 (1.6%)	1.3
(P) Inorganic ion transport and metabolism	pCel	21 (4.2%)	4.9
(T) Signal transduction mechanisms	pCel	11 (2.2%)	2.3
(C) Energy production and conversion	Met	14 (2.8%)	3.9
(H) Coenzyme metabolism	Met	19 (3.8%)	3.4
(I) Lipid metabolism	Met	14 (2.8%)	2.4
(G) Carbohydrate transport and metabolism	Met	21 (4.2%)	3.6
(E) Amino acid transport and metabolism	Met	28 (5.6%)	5.8
(F) Nucleotide transport and metabolism	Met	18 (3.6%)	2.1
(Q) Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	Met	3 (0.6%)	1.7
(R) General function prediction only	Poor	29 (5.8%)	8.0
(S) Function unknown	Poor	17 (3.4%)	5.0
Not in COG	-----	204 (40.6%)	33.3

Cat: Categories; Cp: *Corynebacterium pseudotuberculosis*

*Description of column data: Inf (information storage and processing), pCel (cellular processes), Met (metabolism), Poor (poorly characterized).

**Number of genes found (and partial percentages) in the *cp* genome. The absolute number is larger than 514, since some genes were classified into more than one category.

***Percentage in the genus *Corynebacterium* according to COG data
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/coxik.cgi?gi=375>)

V

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

V.1. Conclusões

A utilização das GSSs aqui obtidas poderão auxiliar na melhor compreensão do genoma de *C. pseudotuberculosis* baseando-se, principalmente, em genômica comparativa utilizando bactérias filogeneticamente próximas. Considerando que pouco se sabe sobre o conteúdo gênico deste patógeno, conseqüentemente, pouco se compreende sobre os mecanismos moleculares de virulência e patogenicidade deste microrganismo, este trabalho pode, também, auxiliar o melhor entendimento de tais questões. Através das inferências e predições, *in silico*, sobre prováveis genes e grupos gênicos funcionais, bem como sua relação filogenética a outras bactérias do gênero, pode-se então classificar diversas regiões do seu genoma.

Das 1440 GSSs geradas de *C. pseudotuberculosis* T2, cerca de 966 GSSs foram depositadas no banco de dados GenBank (NCBI), com os números de acesso de ER770684 à ER771646. Após o processamento, foram obtidas 500 seqüências não redundantes, que foram analisadas e apresentaram tamanho médio de 400 pb, perfazendo um total de 200.000 bases geradas. Comparando-se esse resultado aos resultados de obtidos de outras bactérias do gênero com os genomas completamente seqüenciados, foi representado quase 10% do genoma de *C. pseudotuberculosis* através das GSSs geradas.

Genomas microbianos são constituídos de pouca região não codificadora, com isso, a predição gênica torna-se mais fácil. A biblioteca construída mostrou aproximadamente 10% de representação do genoma, uma ampla representatividade das mais variadas categorias funcionais celulares, sem muita redundância. Os resultados obtidos nessas análises serão usados em genômica comparativa entre as duas linhagens de *C. pseudotuberculosis*.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

- As proteínas produzidas pelas bactérias do gênero *Corynebacterium* (levando em consideração as espécies que já tiveram seu genoma seqüenciado) apresentam uma maior similaridade ao nível aminoacídico do que ao nível gênico.

- Nas análises de similaridades feitas através das GSSs, *C. pseudotuberculosis* T2 apresentou maior similaridade à *C. diphtheriae* do que às demais espécies já sequenciadas desse gênero, o que reafirma os dados contidos em trabalhos anteriores da estreita relação filogenética entre os dois patógenos.

- Na análise de sintonia gênica, pode-se perceber que a ordem gênica do gênero provavelmente é conservada, exceto pela observação de alguns rearranjos, como inversões gênicas em *C. jeikeium*, reforçando dados da literatura, que descrevem essas mudanças no seu arranjo genômico.

- Foi detectada a presença de três genes provavelmente exclusivos de algumas espécies do gênero como *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* (PIP; oppD e NADPH), levantando a hipótese de perda gênica desses genes ou evento de transferência horizontal nas demais espécies cujo genoma foi seqüenciado.

- O conjunto de genes identificados no trabalho será testado em análises comparativas de linhagens utilizando a técnica MLST.

V.2. Perspectivas

No contexto de genômica comparativa, os dados aqui obtidos podem ser também utilizados para análises de plasticidade genômica, uma vez que para a construção da biblioteca foi utilizada a linhagem de *C. pseudotuberculosis* T2, diferente da linhagem que está sendo seqüenciada pela RGMG. Isso vai permitir analisar diferenças sutis entre os genomas das linhagens, tais como perda ou ganho gênico, duplicações e inversões, fazendo compreender como determinadas diferenças podem atuar nas linhagens e fazer com que cada linhagem bacteriana apresente aspectos diferentes como, por exemplo, uma ser mais ou menos virulenta em relação a outra. Poderá auxiliar também em estudos de epidemiologia molecular, uma vez que pode fornecer informações sobre as características de determinadas linhagens e sua ocorrência em determinadas regiões. Com isso, pode ser realizados a prevenção e o tratamento da LC não só nos rebanhos caprinos e ovinos, mas também utilizando outros isolados.

Outra perspectiva que o trabalho fornece é a utilização dos novos genes aqui identificados como alvo para novas terapias e diagnósticos. Esses genes codificam as proteínas Imino-peptidase (PIP), NADP oxireductase (NADPH) e o oppD que codifica um dipeptídeo transmembrânico – ABC transportador.

Estudos com esses três genes descritos na literatura fornecem dados sobre seus possíveis papéis, que muitas vezes estão ligados à virulência. Em *Mycobacterium bovis* o gene oppD está ligado a nutrição e crescimento celular e organizado em um

operon oppBCDA. Em *Streptococcus sp.* esse mesmo operon regula negativamente genes ligados à virulência. Já o PIP, que codifica uma prolina iminopeptidase em *Xanthomonas campestris* está envolvida com sinalização célula-célula, dentro de um processo denominado *quorum sensing*. Em *Helicobacter pylori* o NADPH está envolvido com a persistência do patógeno dentro do hospedeiro. Estudos com mutantes de tais genes podem elucidar possíveis mecanismos de virulência e auxiliar no controle da LC.

VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI.1.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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*; 47(4):287-93, 2000.

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.

ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; 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.*; 59:67–81, 2003.

ARVAND, M.; FEIL, E.J.; GILADI, M.; BOULOUIS, H.; VIENZENS, J. Multi-Locus Sequence Typing of Bartonella henselae Isolates from Three Continents Reveals Hypervirulent and Feline-Associated Clones. *PLOS*; 12:1-8, 2007.

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

BANSAL, A.K. Bioinformatics in microbial biotechnology – a mini review. *Microbial Cell Factories*; 4(1):19, 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.*; 79:51–57, 2002.

BERNHEIMER, A.W.; CAMPBELL, B.J.; FORRESTER, L.J. Comparative toxicology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Science*. 590-591, 1985.

BHATIA, V.; SINHA, M.; LUXON, B.; GARG, N. Utility of the *Trypanosoma cruzi* Sequence Database for Identification of Potential Vaccine Candidates by In Silico and In Vitro Screening. *Infection and Immunity*; 72: 6245–6254, 2004.

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.*; 208:41–45, 2002.

BINFORD, G.J.; CORDES, M.H.J.; WELLS, M.A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon*; 45:547–560, 2005.

BINNEWIES, T.T.; MOTRO, Y.; HALLIN, P.F.; LUND, O.; DUNN, D.; TOM, L.A.; HAMPSON, D.J.; BELLGARD, M.; WASSENAAR, T.M.; USSERY, D.W. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Funct Integr Genomics. Review.*; 6: 165–185, 2006.

BINNS, S.H.; BAIRLEY, M.; GREEN, L.E.; Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999. *Vet. Rec.*; 150(9):263-268, 2002.

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

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

CARMINATI, R. ; CERQUEIRA, R.B. ; COSTA, L.F.M. ; PAULE, B.J.A. ; VALE, V.L.C.; REGIS, L.F. ; FREIRE, S.N.; SCHAEER, R. ; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas, Salvador-Bahia*, v. 1, n. 2, p. 88-93, 2003.

CARNE, H.R. & ONON, E.O. Action of *Corynebacterium. ovis* exotoxin. on endothelial. cells of blood vessels. *Nature (London)*. 271:246-248, 1978.

CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M.; EFSTRATIOU, A.; DOVER, L.G.; HOLDEN, M.T.G.; PALLEN, 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.; BARREL, B.G.; PARKHILL, J. The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.* 31:6516-6523, 2003.

COLE, S.T.; R. BROSCHE, J.; PARKHILL, T.; GARNIER, C.; CHURCHER, D.; HARRIS, S.V. GORDON, K.; EIGLMEIER, S.; GAS, C.E.; BARRY III, F.; TEKAIA, K.; BADCOCK, D.; BASHAM, D.; BROWN, T.; CHILLINGWORTH, R.; CONNOR, R.; DAVIES, K.; DEVLIN, T.; FELTWELL, S.; GENTLES, N.; HAMLIN, S.; HOLROYD, T.; HORNSBY, K.; JAGELS, B.G.; et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*; 393:537–544, 1998.

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.*; 38:2633– 2637, 2000.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos doméstico*. 2.ed. Rio de Janeiro : Medsi, 1992 Mastites: p.117-131.

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

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

DORELLA, F.A., PACHECO, L.G., COELHO, K.S., ROCHA, C., LOBO, F.P., FRANCO, G.R., MEYER, R., CARDOSO, P.G., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. Sequenciamento do genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pela rede genoma de Minas Gerais: impactos esperados na ovino e capricultura nacional. **Biotecnologia e saúde animal.** 1^a ed. Editora Universidade Federal de Viçosa. p.111-150, 2007. 288pp.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res.*; 37(2):201-18. 2006 a. Review

DORELLA, F.A.; FACHIN, M.S.; BILLAULT, A.; DIAS NETO, E.; SORAVITO, C.; OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. *Genet Mol Res.*; 5(4):653-63, 2006 b.

DORELLA, F.A.; ESTEVAM, E.M.; PACHECO, L.G.; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.; GOMES EA; BARSANTE MM; OLIVEIRA SC; MEYER R; MIYOSHI A; AZEVEDO V. In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl Environ Microbiol.*; 72(11):7368-72, 2006 c.

EGEN, N.B.; CUEVAS, W.A.; 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.*; 50(8):1319-22, 1989.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*; 8:186–194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*; 8:175–185, 1998.

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.*; 18:571–574, 2001.

FLEISCHMANN, R.D.; ALLAND, D.; EISEN, J.A.; CARPENTER, L.; WHITE, O.; PETERSON, J.; DEBOY, R.; DODSON, R.; GWINN, M.; HAFT, D.; HICKEY, E.; KOLONAY, J.F.; NELSON, W.C.; UMayAM, L.A.; ERMOLAEVA, M.; SALZBERG, S.L.; DELCHER, A.; UTTERBACK, T.; WEIDMAN, J.; KHOURI, H.; GILL, J.; MIKULA, A.; BISHAI, W.; JACOBS, W.R.; VENTER, J.C.; FRASER, C.M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of Bacteriology*; 184(19):5479-5490, 2002.

FSIHI, H.; COLE, S.T. The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel *polA* locus associated with genomic variability. *Mol Microbiol.*; 16(5):909-19, 1995.

GIBSON, C.M.; AND CAPARON, M.G. Alkaline phosphatase reporter transposon for identification of genes encoding secreted proteins in gram-positive microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*; 68:928-932. 2002.

GOUVEIA, A.M.G. Linfadenite caseosa. *Cabra & Bodes*; 2(5):12-13,1986.

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

HADFIELD, T.L.; MCEVOY, P.; POLOTSKY, Y.; TZINSERLING, V.A.; YAKOVLEV, A.A. The pathology of diphtheria. *J. Infect. Dis.*; 181(Suppl. 1):S116–S120, 2000.

HARD, G.C. Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. *J Med Microbiol.*; 5(4):483–491, 1972.

HAYNES, J.A.; TKALCEVIC, J.; NISBET, I.T. Production of an enzymatically inactive analog of phospholipase D from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Gene*. 119(1):119–121, 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*; 17, 802–808, 1999.

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.*; 60:2900–2905, 1992.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Irregular, nonsporulating 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 and Wilkins, Baltimore, 1994, p. 593.

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.*; 41:453–460, 1997.

IKEDA, M. and NAKAGAWA, S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 62:99-109, 2003.

ISHIKAWA, J.; YAMASHITA, A.; MIKAMI, Y.; HOSHINO, Y.; KURITA, H.; HOTTA, K.; SHIBA, T. & HATTORI, M. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:14925–14930, 2004.

JOIN-LAMBERT, O.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J-L.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatr Infect Dis J.*; 25(9):848-851, 2006.

JOLLY, R.D. Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. *J. Appl. Bact.*, 29(1):189-196, 1966.

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

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 and Wilkins, Baltimore, 1986, pp. 1261–1282.

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.; KRAMER, 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.*; 104:5–25, 2003. .

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

KHAMIS, A.; RAOUL, D.; LA SCOLA, B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.* 43:1934–1936, 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.*; 37:1714–1720, 1999.

KOFFAS, M.; STEPHANOPOULOS, G. Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology. *Curr Opin Biotechnol.*; 16(3):361-6, 2005.

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

LEHMAN, K.B.; NEUMANN, R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 1st Ed., (1896) J.F. Lehmann, Munchen.

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

LOBO, F.P., PACHECO, L.G., COELHO, K.S., ROCHA, C., DORELLA, F.A., FRANCO, G.R., MEYER, R., CARDOSO, P.G., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V. Sequenciamento do genoma de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pela rede genoma de Minas Gerais: impactos esperados na ovino e capricultura nacional. **Biotecnologia e saúde animal.** 1ª ed. Editora Universidade Federal de Viçosa. p.111-150, 2007. 288pp.

MARGULIES, M. et al. Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature*; 15: 376–380, 2005.

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*, 156: 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.*; 100:129–137, 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, 1967, pp. 425–440.

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

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

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

- MUZZI, A.; MASSIGNANI, V.; RAPPUOLI.** The pan-genome: towards a knowledge-based discovery of novel targets for vaccines and antibacterials. *Drug Discovery Today*, 12: 429-439, 2007.
- NISHIO, Y.; NAKAMURA, Y.; KAWARABAYASI, Y.; USUDA, Y.; KIMURA, E.; SUGIMOTO, S.; MATSUI, K.; YAMAGISHI, A.; KIKUCHI, H.; IKEO, K.; GOJOBORI, T.** Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res.*; 13:1572–1579, 2003.
- 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.*; 66:86–92, 2002.
- PACHECO, L.G.C; PENA, R.R.; CASTRO, T.L.P.; DORELLA, F.A.; BAHIA, R.C.; CARMINATI, R.; FROTA, M.N.L. OLIVEIRA, S.C.; MEYER, R.; ALVES, F.S.F.; MIYOSHI, A. & AZEVEDO, V.** Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 1-7, 2007.
- PASCUAL, C.; LAWSON, P.A.; FARROW, J.A.; GIMENEZ, M.N.; COLLINS, M.D.** Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol.*; 45(4):724-8, 1995.
- 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.*; 71:47–49, 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.*, 81:91–95, 2003.
- PAUSTIAN, M.L.; AMONSIN, A.; KAPUR, V.; BANNANTINE, J.P.** Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's Disease. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 2675-2681, 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.* 24:185–191, 1997.
- PERTEA, G.; HUANG, X.; LIANG, F.; ANTONESCU, V.; SULTANA, R.; KARAMYCHEVA, S.; LEE, Y.; WHITE, J.; CHEUNG, F.; PARVIZI, B.; TSAI, J.; QUACKENBUSH, J.** TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics*; 19(5):651-2, 2003.
- PIONTKOWSKI, M.D.; SHIVERS, D.W.** Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212:1765–1768, 1998.

POGSON, C.A.; SIMMONS, C.P.; STRUGNELL, R.A.; HODGSON, A.L.M. Cloning and manipulation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis recA* gene for live vaccine vector development. *FEMS Microbiol. Lett.*, 142:139–145, 1996.

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*; 147:1365–1382, 2001.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. Mastite. In: _____. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 541-629.

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.* 126:271–276, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.

SCHWARTZ, I. Microbial Genomics: From Sequence to Function. *Emerging Infectious Diseases*; 6: 493-495, 2000.

SELIM, A.S. O edematous skin disease of buffalo in Egypt. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.*; 48:241–258, 2001.

SIMMONS, C.P.; HODGSON, A.L.M.; STRUGNELL, R.A. Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.*; 65:3048–3056, 1997.

SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.*; 5:156–160, 1977.

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

STANFORD, K.; BROGDEN, K.A.; MCCLELLAND, 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.*; 62:38–43, 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.*; 49:1–9, 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.*; 41:649–655, 1997.

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

TAUCH, A.; BISCHOFF, N.; PÜHLER, A. & KALINOWSKI, J. Comparative genomics identified two conserved DNA modules in corinebacterial plasmid family present in clinical isolates of opportunistic human pathogen *Corynebacterium jeikeium*. *Plasmid*, 52: 102-118, 2004.

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.* 187: 4671-4682, 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.* 146:633–641, 1995.

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.*, 62:2562–2567, 1994.

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

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

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N.Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. *Vet. Q.*; 18:87–89, 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.*; 15:315–320, 2004.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L. & MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J. Comput. Biol.* 7 :203-214, 2000.

VII

ANEXOS

VII. ANEXOS

VII.1. MATERIAIS E MÉTODOS

VII.1.1. Equipamentos utilizados

- Agitador magnético de soluções (TradeLab)
- Aparato para eletroforese horizontal (Gibco BRL Horizon® 58)
- Balança de precisão (Marte)
- Banho-maria (Precision)
- Capela de exaustão (Permutation)
- Micro Centrífuga (Eppendorf 5417C)
- Centrífuga refrigerada (Jouan MR 23i)
- Equipamento de fotodocumentação (Kodak DC40)
- Espectrofotômetro (Bio-Rad)
- Estufa microbiológica (Nova Ética)
- Fluxo laminar (Veco)
- Forno Microondas (CCE)
- Freezer -20°C (Electrolux)
- Freezer -80°C (Sanyo)
- Micropipetas (Gilson Pipetman®)
- pHMETRO (Digimed)
- Seqüenciador automático (Amersham MegaBACE 1000)
- Shaker incubador (Nova Ética)
- Termociclador (MJ Research, Inc. PTC-100)
- Transiluminador (BioSystematica)
- Vortex (IKA)

VII.1.2. Reagentes e soluções

VII.1.2.1. Reagentes químicos e analíticos

- Acetato de Potássio (Synth)
- Acetato de Amônio (Amersham Biosciences)
- Ampicilina (Sigma)
- Ácido Bórico (Cirq)
- Ácido Acético (Synth)
- Agarose (Eurobio)
- Água ultra-pura
- Álcool isoamílico (Synth)
- Álcool isopropílico (Merck)
- Álcool etílico (Merck)
- Azul de bromofenol (Synth)
- Brometo de etídio (Eurobio)
- Clorofórmio (Cirq)
- EDTA (Synth)
- Fenol UltraPure™ Buffer-Saturated (Invitrogen)
- Glicerina (Synth)
- Glicose (Merck)
- Glicogênio (Gibco)
- HCl (Merck)
- IPTG (Gibco BRL)
- Lisozima (USB)
- Matriz de poliacrilamida (Ge)
- MgCl (Invitrogen)

- NaAc (Synth)
- NaCl (Cirq)
- NaOH (Cin. Química)
- SDS (Synth)
- Sódio-N-lauroilsarcosina (USB)
- Tris-base (Invitrogen)
- X-gal (USB)

VII.1.2.2. Soluções

- **Acetato de Potássio (5M):** 246,87 g de acetato de potássio em 500 mL de água destilada.
- **Acetato de Potássio (3M):** 60 mL de acetato de potássio (5M); 11,5 mL de Ácido acético glacial e 28,5 mL de água ultra pura autoclavada.
- **Acetato de Sódio (3M):** 246 g acetato de sódio em 1 L água destilada.
- **Ampicilina (100 mg/mL):** 1 g da solução de ampicilina em 10 mL de água ultra-pura autoclavada.
- **Brometo de etídio:** Solução 0,1-0,5 µg/mL.
- **Cloreto de Sódio (5M):** 14,51 g de cloreto de sódio em 50 mL de água destilada.
- **Etanol 70%:** 70 mL de etanol absoluto e 30 mL de água destilada.
- **EDTA (0,5M):** 18,61 g em 100 mL de água destilada. pH 8,0.
- **Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico:** 25 mL de solução saturada de fenol; 24 mL de clorofórmio; e 1 mL de álcool isoamílico.
- **GET:** 23 mL de glicose 20%; 10 mL de EDTA 0,5M pH 8,0 autoclavado; 13 mL de Tris-HCl 1M pH 7,4 em 500 mL de água ultra pura.
- **Glicerol 10%:** 100 mL de Glicerina em 1L de água destilada
- **Glicerol 50%:** 50 mL de Glicerina em 50 mL de água destilada.

- **Glicogênio (20mg/ml):** 100 mg de glicogênio em 5 mL de água destilada.
- **Glicose 20%:** 20 g de glicose em 100 mL de água ultra pura.
- **Hidróxido de Sódio (4M):** 8 g em 40 mL de água ultra pura.
- **Sarcosil 30%:** 30 g de sódio-N-lauroilsarcosina em 100 mL de água destilada.
- **Tampão de Depósito (5X):** Glicerol a 50%; Azul de bromofenol a 0,20%; e solvente TBE a 2,5X.
- **TBE:** 500 mM de Tris-HCl; 60 mM de ácido bórico; 83 mM de EDTA; pH 8,0 - 8,5.
- **Tris-EDTA-RNase (Solução I – Extração de DNA genômico):** Tris-HCl (10 mM); EDTA (10 mM); NaCl (300 mM); RNase A (50 µg/mL).
- **Tris-EDTA-lisozima (Solução II – Extração de DNA genômico):** Tris-HCl (10 mM); EDTA (10 mM); NaCl (300 mM); lisozima (10 mg/mL).
- **Tris-HCl (1M):** 12,11 g em 100 mL de água destilada. pH 7,4.
- **Tris-EDTA:** 10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl.
- **SDS 10%:** 10 g de Dodecil sulfato de sódio em 100 mL de água destilada.

VII.1.3. Meios de cultura

- **Luria-Bertani (LB):** Peptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L. pH 7,8.
- **LB-ágar:** Peptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L e 15 g de ágar bacteriológico. pH 7,8.
- **LB-ágar-X-gal- Ampicilina:** Meio LB-ágar acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e X-Gal (40 µg/mL).
- **Caldo “Infusão Cérebro-Coração” (Brain Heart Infusion- BHI):** 37 g de BHI em pó em 1 L de água destilada; pH 7,4.
- **BHI – ágar sangue:** BHI acrescido de ágar bacteriológico (1,5%) e sangue de carneiro na concentração (5%).

- **BHI – ágar-canamicina:** BHI – ágar acrescido de canamicina (25 µg/mL).

VII.1.4. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens bacterianas empregadas neste trabalho estão listadas na tabela 3. Os meios de cultivo utilizados foram o LB para *Escherichia coli* e o BHI para *C. pseudotuberculosis*. Tanto a cultura de *E. coli* quanto a de *C. pseudotuberculosis* foram crescidas a 37°C sob agitação. O cultivo de *E. coli* foi realizado entre 16-22 horas e de *C. pseudotuberculosis* foi de 48-72 horas. Além dos meios de cultivo, as bactérias, quando necessário, foram crescidas em presença dos antibióticos adequados, sendo ampicilina utilizada para *E. coli* e canamicina para *C. pseudotuberculosis*.

TABELA 3: Linhagens bacterianas utilizadas no trabalho.

Espécie	Linhagem	Fonte
<i>E. coli</i>	DH5α [sup44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1]	Invitrogen
<i>C.pseudotuberculosis</i> ^a	linhagem T2	UFBA – Instituto de Ciências da Saúde
<i>C. pseudotuberculosis</i> ^b	linhagem 1002	UFBA - Instituto de Ciências da Saúde
<i>C. ulcerans</i> ^c	CIP 5927	França – Instituto Pasteur
<i>C. diphtheriae</i> ^d	isolado	FIOCRUZ
<i>C. jeikeium</i> ^e	ULCA3. 675,1	Bélgica – Hospital Universitário Ghet
<i>C. renale</i> ^f	CIP6937	França - Instituto Pasteur

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

^c: linhagem virulenta de *C. ulcerans* pertencente à coleção de microorganismos do Instituto Pasteur, França.

^d: linhagem virulenta de *C. renale* pertencente à coleção de microorganismos do Instituto Pasteur, França.

^e: bactéria isolada de paciente com difteria, FIOCRUZ, Brasil.

^f: bactéria isolada de paciente no Hospital Universitário Ghet, Bélgica.

VII.1.5. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada da mesma forma para todas as linhagens bacterianas de *C. pseudotuberculosis* utilizadas neste estudo. Culturas de 20 mL foram centrifugadas a 5.000 rpm, por 10 min., a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1 mL de solução I (item VII.1.2.2). Após homogeneizada, a mistura foi novamente centrifugada, desta vez, a 13.000 rpm, por 10 min., à temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado, 1 mL de solução II (item VII.1.2.2) foi adicionado. Após ressuspender o precipitado, a amostra foi incubada em banho-maria por 30 min. a 37°C. Foram adicionados 30 µL de sarcosil 30%; a amostra foi homogeneizada por 15 min. e então deixada em banho-maria a 65°C por 5 min., seguido por incubação a 4°C por 5 min.

Para purificação do DNA extraído, foi utilizado um protocolo padrão de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989). Em resumo, 1 mL da solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (item VII.1.2.2) foi adicionado à amostra. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 7 min. A fase superior da amostra foi retirada e transferida para um novo microtubo de 2 mL. Esse processo foi repetido mais uma vez e em seguida adicionou-se 2,5 vol. de álcool etílico, NaOAC (3M) e glicogênio (20mg/mL) numa quantidade equivalente a 10% e 1%, respectivamente, do sobrenadante. O DNA foi precipitado O.N. a -20°C. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 min., o DNA foi lavado com álcool etílico a 70% e ressuspense em água ultra pura.

VII.1.6. Resolução eletroforética

Após a extração, o DNA genômico foi dosado e teve sua qualidade analisada através de resolução eletroforética. As amostras de DNA acrescida de 1:5 do volume de tampão de amostra (item VII.1.2.2) foram fracionados em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 1X (item VII.1.2.2), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). As corridas foram realizadas a 90 Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado e o gel fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta (320nm) através do sistema de documentação fotográfica “Kodak Digital Science™ DC40 câmera” (Kodak) e a foto processada pelo programa “Electrophoresis Documentation and Analysis System” (Kodak).

VII.1.7. Construção da biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis*

VII.1.7.1. Fragmentação do DNA genômico por nebulização

O DNA genômico obtido de *C. pseudotuberculosis* T2 foi fragmentado através de nebulização (de acordo com o manual do kit TOPO® shotgun - Invitrogen) de maneira que resultasse em fragmentos entre 1000 – 2000 pb.

O DNA genômico foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos resultando numa solução de DNA (60 ng/μL), onde foi inserido dentro do nebulizador (Figura 6) juntamente com 750 μL de Shearinhg Buffer e incubado no gelo. Após a incubação por 10 minutos, o DNA foi nebulizado a 9-10 psi por 30, 60 e 90 segundos respectivamente. Após a nebulização, a solução foi alíquotada em 3 microtubos de 0,5 mL onde cada microtubo continha 300 μL da solução de DNA fragmentado.

Cada alíquota, referente aos tempos supracitados, foi transferida para novos microtubos de 1,5 mL e para cada 250 μL de solução de DNA fragmentado adicionou-se: 20 μL de acetato de sódio 3M pH = 8,0; 625 μL de álcool etílico absoluto e 2 μL de glicogênio (20 mg/mL). As amostras foram incubadas no freezer (-20° C) por 40 minutos e após, foram centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram homogeneizados por inversão e ressuspensos com 800 μL de álcool etílico 80% e centrifugados por mais 5 minutos. Os precipitados foram incubados na estufa a 50 °C e ressuspensos em 30 μL de água ultra pura.

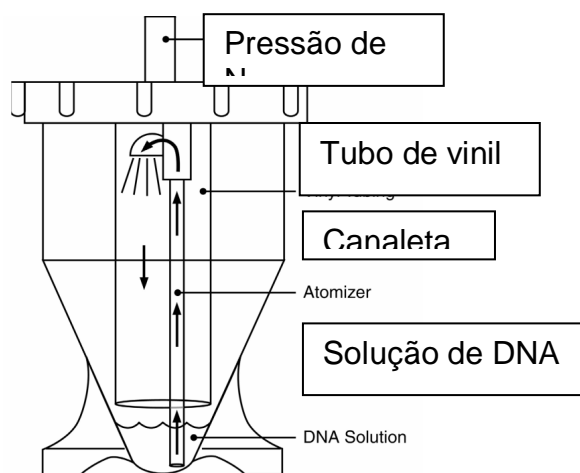


FIGURA 6: Aparelho nebulizador para fragmentação mecânica do DNA.

VII.1.7.2. Obtenção de fragmentos de DNA com “pontas cegas”

Após o processo de fragmentação, as amostras de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* T2 foram submetidas ao reparo das extremidades 5' e 3' para que as pontas se tornassem cegas (*blunt-end*). O processo foi realizado de acordo com o manual do fabricante. As amostras foram acrescidas 30 µL de DNA (100ng/µL), 5 µL de Blunting Buffer 10X, 1 µL de BSA (1mg/mL), 5 µL de dNTP's (250 µM), 2 µL de T4 DNA polimerase, 2 µL de Klenow DNA polimerase e água deionizada para um volume final de 50 µL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por duas horas à temperatura ambiente, após esse período foram centrifugadas por 10 segundos à 13.000 rpm. Após centrifugação as reações foram incubadas no banho-maria a 75°C por 20 minutos e após a incubação, armazenadas no freezer a -20°C.

VII.1.7.3. Desfosforilação dos fragmentos de DNA

Após o procedimento de reparo nas pontas cegas, foi necessário desfosforilá-los para que os fragmentos se tornassem apropriados para a ligação no vetor pCR®-4Blunt -TOPO shotgun (Invitrogen). Para tanto, às amostras obtidas no item VII.1.7.2, os fragmentos de DNA nebulizados e com as extremidades cegas obtidos do DNA nebulizado foram desfosforilados. A reação de 50 µL foi incubada no gelo e foi adicionado 40 µL de água ultra pura, 5 µL de Blunting Buffer 10X e 5 µL de CIP (*calf intestinal phosphatase*), totalizando 100 µL de volume final de reação. A mesma foi incubada no banho-maria à 37°C por 1 hora. Após esse período, foram acrescidos 50 µL de fenol:clorofórmio, homogeneizada a amostra e finalmente centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante coletado em um novo microtubo.

Para purificação do produto desfosforilado, adicionou-se às reações 10 µL de acetato de sódio 3M pH = 5,2, 1 µL de Glicogênio (20 mg/mL) e 300 µL de álcool etílico 80% gelado. A reação incubada no freezer à -80°C por 15 minutos, foi centrifugada por 14 minutos a 12.000 rpm à 4°C.

Ao precipitado foram adicionados 500 µL de álcool etílico 80% gelado. Após esse passo, o precipitado foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm, em seguida secado na estufa à 60°C, finalmente o DNA foi ressuspensão em 20 µL de água ultra pura estéril.

VII.1.7.4. Confecção de *E. coli* eletrocompetente

Uma colônia de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 5 mL de meio LB e incubada a 37°C durante 18 horas sob agitação de 150 rpm. Uma alíquota (3 mL) desta cultura foi então inoculada em 300 mL de LB e incubada a 37°C sob agitação até atingir absorvância (OD_{600nm}) entre 0,2 e 0,3. Uma vez alcançado este valor, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm durante 18 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 300 mL de uma solução de glicerol 10% estéril; processo que foi repetido 4 vezes mais. Após a última lavagem, as bactérias foram ressuspenso em 1 mL de solução de glicerol 10%. Esse 1 mL foi dividido em alíquotas de 100 μ L que foram estocadas à -70°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota com células eletrocompetentes estocadas à -70°C, foi colocada no gelo durante 5 minutos. Em seguida adicionou-se 10 ng/ μ L do plasmídeo pUC18 (controle positivo). Como controle negativo, foi utilizado apenas uma alíquota de células, às quais nenhum DNA foi adicionado. Ambas as amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação, previamente resfriadas e foram submetidas a um pulso de 2.5 V, capacitância 25 μ FD e resistência de 200 OHMS utilizando um eletroporador CelljectUno (Thermo Electro Corporation).

Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 mL de meio LB às células e estas foram incubadas à 37°C por uma hora. Diluições de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas a 37°C durante 18 horas. A eficiência de transformação obtida foi de 8,7 x 10⁷ unidades formadoras de colônia (UFC) por micrograma de DNA.

VII.1.7.5. Ligação dos insertos genômicos no vetor

A ligação dos fragmentos de DNA genômico de *C. pseudotuberculosis* T2 processados no item VII.1.7.1, seguiu-se os procedimentos recomendados no manual do fabricante. A reação de ligação conteve: 4 μ L do DNA genômico, 1 μ L de Salt Solution, 1 μ L do vetor pCR®-4Blunt -TOPO® shotgun; e então a mistura foi incubada à 37°C por 1 hora.

VII.1.7.6. Transformação de *E. coli*

Após a ligação dos insertos no vetor pCR®-4Blunt -TOPO ® shotgun, foi realizada a transformação de *E. coli* DH5α (Figura 7). A utilização das células eletrocompetentes confeccionadas de acordo com o item VII.1.7.4 ocorreu da seguinte maneira: foi adicionado 4µL da ligação de cada DNA (vetor: insertos genômicos) às células (100 µL) que foram incubadas no gelo por 10 minutos.

Após a incubação, a mistura foi transferida para as cubetas de eletroporação. Como “controle negativo” do experimento foi utilizado 4 µL de água ultra pura. Imediatamente após a eletroporação foi adicionado 1 mL de meio LB previamente aquecido à 37°C para a ressuspensão das células e estas foram incubadas no banho-maria à 37° C por 2 horas.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em transferir uma alíquota de 100 µL da suspensão de células eletroporadas para placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 16 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias.

A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a estocagem dos clones positivos em placas de polipropileno de 96 poços.

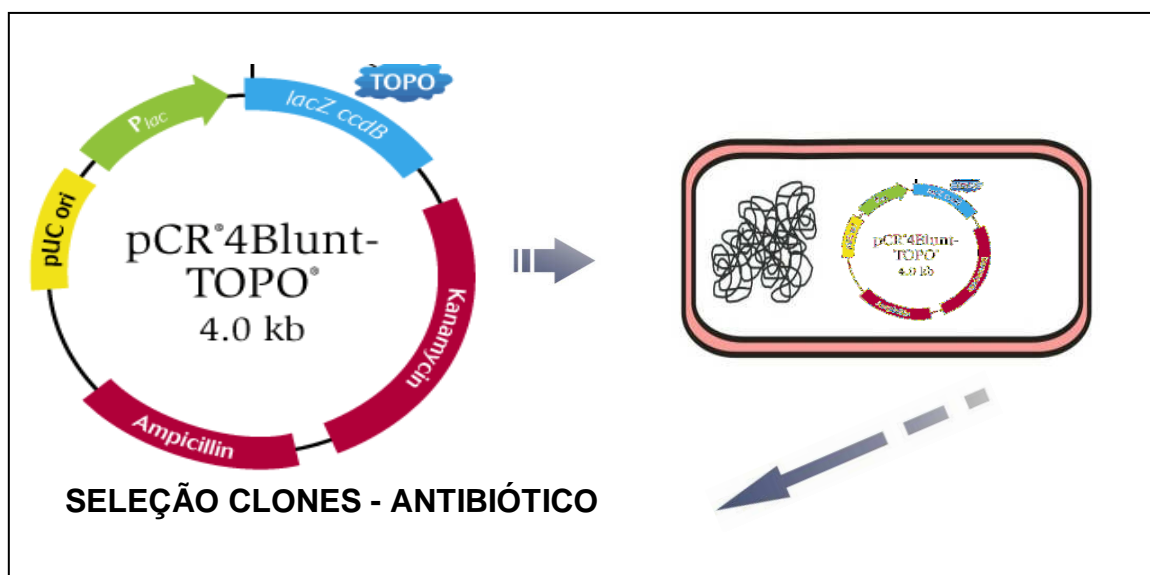


FIGURA 7: Construção da biblioteca genômica de *C. pseudotuberculosis*. Transformação de *E. coli* com os fragmentos genômicos de *C. pseudotuberculosis* e seleção dos clones positivos.

VII.1.7.7. Estocagem dos clones positivos

Após seleção dos clones brancos, os mesmos foram individualmente crescidos nos poços de placas de polipropileno. Oito placas completas foram obtidas no final da seleção. Para o crescimento da cultura de células foi utilizado 200 µL de meio LB líquido suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e 40% de glicerol. As placas foram então incubadas no agitador por 16-18 horas a 37°C sob agitação de 120 rpm e após o crescimento as placas foram armazenadas no freezer a -80°C.

VII.1.7.8. Extração do DNA plasmidiano de *E. coli*

Trinta microlitros do cultivo de cada clone foram utilizados para a extração de DNA plasmidiano. Em microplacas de crescimento de cultura novas, foram adicionados 1,2 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As culturas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas sob agitação (200 rpm).

Após este período, foram feitas novas culturas estoques em glicerol de cada uma das oito placas (100 µL da cultura + 100 µL de glicerol 50%) sendo estas seladas com um adesivo e armazenadas a -80° C. Com o restante da cultura (1,1 mL) foi realizada a extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina como descrito por Sambrook et al. (1989) com algumas modificações.

Após a centrifugação das microplacas contendo as culturas, por 6 minutos a 4.000 rpm, foi descartado o sobrenadante e após esse procedimento as células foram ressuspensas em 240 µL da solução GET (item VII.1.2.2). Os passos acima foram repetidos, onde foi adicionado 80 µL de solução GET e homogenizado no vortex por 2 minutos. Toda a suspensão de células foi transferida para uma nova placa de polipropileno contendo 2,5 µL de RNase A (10 mg/mL). Foi adicionado a cada poço 80 µL de NaOH 0,2 N/SDS 1%. (1 mL de NaOH 4M + 17 mL H₂O mili-Q + 2 mL de SDS 10%), misturado por inversão (30 vezes) e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos.

Após esse período, foi adicionado ainda 80 µL de acetato de potássio (3M) previamente resfriado, onde foi misturado por inversão e seguida por três incubações: à temperatura ambiente, por 10 minutos na estufa à 90°C por 30 minutos e no gelo por 10 minutos. Depois, foram centrifugadas por 9 minutos a 4000 rpm e transferida a fase

aquosa para placas milipore com filtro anexado a placas com fundo em V. Foi centrifugada por mais 6 minutos a 4000 rpm e adicionado ao filtrado, 100 µL de álcool isopropílico e centrifugado por 45 minutos à 4000 rpm.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e a ele foi adicionado 200 µL de álcool etílico 70% previamente resfriado e centrifugado por 15 minutos à 4000 rpm. Foi adicionado a cada amostra 60 µL de água ultra pura estéril e o DNA plasmidiano foi ressuspensão O.N. A presença e qualidade dos plasmídeos foi verificada através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item VII.1.6.

VII.1.7.9. Confirmação da presença e tamanho do insertos genômicos de *C. pseudotuberculosis* no vetor

Para verificar a presença do inserto e o peso molecular dos fragmentos de DNA clonados no vetor pCR®-Blunt II-TOPO®, os insertos dos DNA plasmidiano foram amplificados por PCR utilizando iniciadores: sentido (5´ CTGGCCGTCGTTTTAC 3´) e antisenso (5´ CAGGAAACAGCTATGAC 3´) do vetor. As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 50 µL, contendo 2 pmoles/µL de cada iniciador; 0,25 mM de dNTPs; 0,1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2mM de MgCl₂, tampão da enzima 1X concentrado (Invitrogen) e 50 ng/µL dos plasmídeos extraídos (item VII.1.1.7.8).

A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto; anelamento durante 1 minuto a 53°C; extensão a 72°C durante 2 minutos; e extensão final por 7 minutos a 72°C. Após a reação, todo o volume foi aplicado em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética realizada sob as mesmas condições descritas no item VII.1.6.

VII.1.8. Geração de Genomic Survey Sequence (GSS)

VII.1.8.1. Reação de seqüenciamento

O DNA plasmidiano contendo os insertos genômicos de *C. pseudotuberculosis* T2 foi submetido a reação de seqüenciamento. Nesta reação, para um volume final de 10 µL, utilizou-se 4 µL de DYEnamic ET-Kit Terminator (Amersham Biosciences), 1µL de

iniciador (10 μ M) (senso ou antisenso; de acordo com item VII.1.7.9) e 2 μ L de água ultra pura estéril. A reação de seqüenciamento seguiu as seguintes condições: a primeira desnaturação ocorreu à 95°C por 40 segundos; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos; anelamento a 55°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

VII.1.8.2. Precipitação

Para a precipitação dos nucleotídeos incorporados, foi utilizado o seguinte protocolo: às amostras de DNA supracitadas, adicionou-se 1 μ L de acetato de Sódio 7,5 M para cada reação de 10 μ L, 30 μ L de etanol 95% gelado e foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, centrifugou-se a placa por 45 minutos a 5000 rpm, e após esse passo o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 100 μ L de etanol 70% gelado em cada amostra e centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão com 10 μ L de tampão 10X de ressuspensão do seqüenciador, as amostras foram protegidas da luz e armazenadas à -20°C.

VII.1.8.3. Seqüenciamento das amostras

O processo de seqüenciamento seguiu os seguintes parâmetros de corrida: para injeção das amostras nos capilares do seqüenciador utilizou-se a voltagem de 6 KV durante 100 segundos. Após a injeção das amostras, a voltagem da corrida foi de 9 KV por 240 minutos. Após a leitura do DNA pelo seqüenciador foi gerada para cada amostra de cada placa um arquivo, no formato *.esd que contém a seqüência nucleotídica resultante e o cromatograma com todos os perfis nucleotídicos obtidos durante a corrida.

VII.1.9. Análises *in silico* das GSS's geradas

VII.1.9.1. Remoção das seqüências de baixa qualidade

Uma vez que uma amostra é processada no seqüenciador, geram-se arquivos contendo as seqüências nucleotídicas de cada amostra contida nas placas. Porém, na maioria das vezes o sinal dos nucleotídeos ainda é fraco no começo do processo de seqüenciamento. Forma-se então uma curva gaussiana, onde a seqüência do interior tem uma melhor qualidade. Utilizando o algoritmo PHRED (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998) com o parâmetro *trim_alt* e *trim-cutoff* no valor de 0,16, cada base recebeu um valor de qualidade e após essa nomeação foi utilizado o algoritmo SeqClean (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tqi/software/>) e baseado nos valores de cada base fornecido pelo PHRED, seqüências de baixa qualidade foram retiradas.

VII.1.9.2. Remoção das regiões com similaridade a vetores

Para remover seqüências com similaridade a vetores, foi utilizado o algoritmo *Cross_match* (<http://www.phrap.org>). No programa foram adicionadas previamente as seqüências correspondente aos iniciadores M13 senso e M13 anti-senso do item VII.1.7.9. Quando as mesmas foram encontradas nas GSS geradas, elas foram substituídas por um X. Novamente foi utilizado o programa Seqclean para retirar tais marcações.

VII.1.9.3. Montagem de “contigs” e alinhamento das GSS's

Foram geradas aproximadamente 1440 GSSs e para melhor aproveitamento das mesmas, bem como geração de seqüências maiores, foi utilizado o algoritmo TGICL (PERTEA et al., 2003), o qual é um programa do tipo “Megablast” (ZHANG et al., 2000), que sobrepõe seqüências que apresentam similaridade formando os *contigs* (seqüências consenso comuns à todas as amostras). Vários *singlets* também foram gerados. Os *contigs* e os *singlets* não redundantes foram então utilizados para várias análises *in silico*

e de genômica comparativa e seqüências menores de 100 pb foram retiradas, temporariamente, do estudo.

VII.1.9.4. Análises de similaridade

As seqüências não-redundantes geradas no item VII.1.9.3, foram utilizadas em buscas de similaridades no programa BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) contidas no banco de dados público *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Dentro desse programa foram utilizadas três categorias específicas: BLASTn que avalia similaridade a nível de nucleotídeos entre as GSS's (*query*) e seqüências já depositadas (*subject*) no banco de dados; BLASTx que avalia a similaridade a nível de aminoácidos e prediz uma provável proteína de acordo com o grau de similaridade e tBLASTx que traduz tanto as seqüências (GSS's) que estão sendo submetidas a análise quanto as seqüências previamente depositadas no banco de dados e a similaridade entre elas. Cada GSS não redundante gerou um resultado.

O melhor resultado gerado, ou *best hit*, foi então utilizado em todas as análises feitas posteriormente. Um valor de *e* maior que 10^{-5} foi utilizado nas análises com o programa BLAST, abaixo disso, as demais seqüências foram descartadas.

VII.1.9.5. Caracterização gênica *in silico* de grupos biológicos funcionais

Utilizando o banco de dados de categorias biológicas funcionais - *Clusters of Orthologous Group* (COG) - que contém aproximadamente 66 genomas microbianos, foram feitas buscas de similaridades para caracterizar *in silico* prováveis grupos funcionais para as GSSs de *C. pseudotuberculosis* em estudo. Esse programa é dividido em duas categorias, uma maior e uma menor. Na maior, ele categoriza as seqüências em grandes grupos tais como: processamento e armazenagem de informação, metabolismo celular e transporte de nutrientes. Já na categoria menor, ela subdivide os grupos maiores em funções como: transporte de aminoácidos, respiração celular, transcrição, tradução. Utilizando esse banco de dados, as GSSs foram um provável grupo funcional nas categorias descritas acima.

VII.1. 9.6. Análises comparativas utilizando o UNIPROT

Utilizando a versão mais recente do banco de dados protéico UNIPROT (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/uniprot/knowledgebase/uniprot_sprot.fasta.gz) as GSS não redundantes (*query*) foram confrontadas contra as seqüências presentes no banco de dados protéico (*subject*) a fim de predizer prováveis proteínas que estão presentes em *C. pseudotuberculosis* T2.

VII.1.10. Genômica comparativa

VII.1.10.1. Análises de similaridade entre *C. pseudotuberculosis* e outras quatro espécies do gênero

Os resultados das buscas de similaridade, utilizando os BLAST citados (BLASTn, BLASTx e TBLASTx) no item VII.1.9.4, foram utilizadas para uma análise de genômica comparativa. Essas análises tiveram como objetivo, averiguar possível observação de conservação gênica entre *C. pseudotuberculosis* T2 e outras quatro espécies de *Corynebacterium* (*C. diphtheriae*, *C. jeikeium*, *C. efficiens* e *C. glutamicum*) que já possuem o genoma seqüenciado. Para isso foram utilizados os *best hits* das GSS's, nas quais foram averiguadas similaridade nucleotídica e em nível de aminoácido. O menor valor de *e* aceitável foi de 10^{-10} .

VII.1.10.2. Uso de bancos de dados para inferências de novas prováveis exclusivas proteínas de *C. pseudotuberculosis*

Os resultados gerados nos itens VII.1.9.5, VII.1.9.6 e VII.1.10.1, foram confrontados contra eles mesmos num dendograma para se obter seqüências que estivessem presentes apenas em *C. pseudotuberculosis* T2 e não nas demais *Corynebacterium*, predizendo assim talvez eventos de perda gênica na espécie.

VII.1.10.3. Análise de sintenia entre *C. pseudotuberculosis* e outras quatro espécies de *Corynebacterium*

Para determinar se a ordem gênica entre as espécies de *Corynebacterium*, aqui estudadas é conservada, foi feita uma análise de sintenia. Para isso, foi construído um gráfico onde foram plotados os *best hits* do tBLASTx supracitados mapeados de acordo com a similaridade entre *C. pseudotuberculosis* e *C. diphtheriae*, espécie filogeneticamente mais próxima.

VII.1.10.4. Confirmação por PCR de prováveis genes exclusivos de *C. pseudotuberculosis*

Para averiguar a hipótese de que os três genes que codificam as proteínas (PIP, NADPH e oppD), estão presentes em apenas algumas espécies do gênero *Corynebacterium*, foram desenhados iniciadores (tabela 4) a partir das GSS's não-redundantes, e realizadas reações de PCR com o objetivo de isolar tais seqüências diretamente do genoma de *C. pseudotuberculosis* T2 e algumas outras espécies do gênero tais como: *C. pseudotuberculosis* 1002, *C. pseudotuberculosis equi*, *C. renale*, *C. ulcerans*, *C. diphtheriae* e *C. jeikeium*.

As reações foram realizadas como segue: volume final de 50 µL, contendo 2 pmoles/µL de cada iniciador; 0,25 mM de dNTPs; 0,1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2mM de MgCl₂, tampão da enzima 1X concentrado (Invitrogen) e 3 µL dos DNA genômicos (50mg/µL) de cada espécie citada acima. A amplificação por PCR, foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto; anelamento a 63°C durante 1 minuto; extensão a 72°C durante 2 minutos; e extensão final por 7 minutos a 72°C. Após a reação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% e a resolução eletroforética realizada sob as mesmas condições descritas no item VII.1.6.

TABELA 4: Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR das 4 GSS's, provavelmente, exclusivas de *C. pseudotuberculosis*.

PCR	Oligonucleotídeos iniciadores
Iniciador "forward" da GSS oppD ^a	5' CCTTACCGAGACAACGTCAT 3'
Iniciador "reverse" da GSS oppD	5' GCCTGGTGCTTATCATTGAT 3'
Iniciador "forward" da GSS PIP ^b	5' AACTGCGGCTTTCTTTATTC 3'
Iniciador "reverse" da GSS PIP	5' GACAAGTGGGAACGGTATCT 3'
Iniciador "forward" da GSS NADPH ^c	5' CTGCGACATAGCTAGGCACT 3'
Iniciador "reverse" da GSS NADPH	5' CCGCCAGACTTTTCTCTACA 3'

^a: Dipeptídeo/Oligopeptídeo ABC transporter.

^b: Prolina Iminopectidase.

^c: NADP oxirredutase.

VII.3. ARTIGO: Mini Review

VII.3.1. A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications.

Vívian D'Afonseca¹, Pablo Matias Moares¹, Fernanda Alves Dorella¹, Luis Gustavo Pacheco¹, Roberto Meyer², Ricardo Wagner Portela², Anderson Miyoshi^{1**}, Vasco Azevedo^{1*}.

1 – Laboratório de Genética Celular e Molecular, Dept. De Biologia Geral, ICB – UFMG.

2- Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Dept. De Bioteração, ICS-UFBA.

Vasco Azevedo* and Anderson Miyoshi** (share credit in this work for senior authorship)

vasco@icb.ufmg.br

miyoshi@icb.ufmg.br

Laboratório de Genética Celular e Molecular, sala Q3 259.

Departamento de Biologia Geral, ICB, UFMG.

Avenida Antônio Carlos, 6627 CP 486.

CEP: 31.270-010 Belo Horizonte – MG, Brazil.

Tel: +55 31 3499-2778

Fax: +55 31 3499-2610

* To whom correspondence should be addressed.

Running Head: Applications of *Corynebacterium pseudotuberculosis* genes.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis, a gram-positive intracellular pathogen, is the etiological agent of caseous lymphadenitis or CLA. This bacterium infects goats and sheep and causes great economic losses worldwide annually, mainly for goat producers. Despite its importance, CLA is still poorly characterized. However, with advances in the genomic field, many *C. pseudotuberculosis* genes have already been characterized, mainly those related to virulence such as phospholipase D. Here, we examined the use of the several available genes of *C. pseudotuberculosis* and reviewed their applications in vaccine construction, more efficient diagnostics for CLA, and control of this disease, among other applications.

Key words: PLD (phospholipase D), RecA, CLA (caseous lymphadenitis)

INTRODUCTION

The genus *Corynebacterium* belongs to the group of actinomycetes that includes the CMN group (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus* species) (Hard *et al.* 1969; Songer *et al.*, 1988; Songer *et al.*, 1997; Paule *et al.*, 2004; Dorella *et al.*, 2006a). These gram-positive bacteria constitute a very heterogeneous group that shares particular characteristics, such as a specific cell wall organization, (Hard, 1975; Collins *et al.*, 1982; Funke *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1998; Connor *et al.*, 2000; Bayan *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2003; Dorella *et al.*, 2006a) and high G+C content (47–74%) (Garg *et al.*, 1985; Goodfellow, 1989; Funke *et al.*, 1995; Navas, 1996; Dorella *et al.*, 2006a). Belonging to this group is *Corynebacterium pseudotuberculosis*, an important animal pathogen and the etiological agent of a disease called caseous lymphadenitis (CLA) (Williamson, 2001).

This disease is spread worldwide, and its considerable economic importance (Williamson, 2001; Paton *et al.*, 2003) has prompted investigation of its pathogenesis. However, the genetic determinants of *C. pseudotuberculosis* virulence are still poorly characterized (Dorella *et al.*, 2006a); moreover, this species has only 19 proteins identified in the GenPept database as showed in Table 1 and about 1,230 genomic survey sequences (GSS) (Dorella *et al.*, 2006b) already deposited in the GenBank database.

The majority of these genes belongs to virulence factors, or modulate positively virulence genes or encode virulence factors that confer pathogenic characteristics to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. For this reason, virulence genes are targets for the development of new vaccines and more efficient therapies and diagnostics in the control of illnesses, mainly CLA which is still managed by rudimentary prophylaxis. In this work, we conducted an overview of the cited genes, as well as their application in helping to control CLA.

Table 1: Genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* deposited in GenPept, National Center for Biotechnology Information – (NCBI).

Accession Number (GenPept)	Putative Protein	Reference
ABI29892	10 kDa chaperonin GroES	Azevedo, V. <i>et al</i> , 2006.
AAV48830	60 kDa chaperonin 1	Azevedo, V. <i>et al</i> , 2004.
ABI75067	65 kDa heat shock protein	Fardel, G & Flandrois, J. P., 2006.
AAB71614	AroB (3-dehydroquinate synthase)	Simmons, C. P. <i>et al</i> , 1997.
AAB71615	AroB (3-dehydroquinase)	Simmons, C. P. <i>et al</i> , 1997.
P96749	AroB (3-dehydroquinate synthase)	Simmons, C. P. <i>et al</i> , 1997.
P96750	AroQ (3-dehydroquinate dehydratase)	Simmons, C. P. <i>et al</i> , 1997.
AAL79811	FagA (integral membrane protein)	Billington, S. J. and Jost, B. H., 2002.
AAL79810	FagB (iron-enterobactin transporter)	Billington, S. J. <i>et al</i> , 2002.
AAL79809	FagC (ATP binding cytoplasmic membrane protein)	Billington, S. J. <i>et al</i> , 2002.
AAL79812	FagD (iron-siderophore binding protein)	Billington, S. J. and Jost, B. H., 2002.
P20626	Phospholipase D precursor	Hodgson, A.L. <i>et al</i> , 1990.
AAA64910	Phospholipase D	Songer, J. G. <i>et al</i> , 1993
AAA99867	Phospholipase D	McNamara, P. J. <i>et al</i> , 1993.
CAA01541	Phospholipase D	-----
AAA82608	Protein recA	Pogson, C. A. <i>et al</i> , 1995.
P48288	Protein recA	Pogson, C. A. <i>et al</i> , 1996.
AAS89201	RpoB (RNA polymerase subunit beta)	Khamis, A. <i>et al</i> , 2004.
AAA67924	Serine proteinase precursor	Wilson, M. J. <i>et al</i> , 1995.

GENES AND THEIR APPLICATIONS

Phospholipase D: virulence factor

After Adrian Hodgson and colleagues (1989) reported the nucleotide sequence, cloning and expression of *C. pseudotuberculosis* phospholipase D gene, several studies about this gene were conducted. Phospholipase D (PLD) has for some years been implicated as the major virulence factor of *C. pseudotuberculosis* (Adrian Hodgson *et al.*, 1999). The *pld* gene encodes an exotoxin (Burrell, 1983; Adrian Hodgson *et al.*, 1994) that probably promotes bacterial dissemination, increasing vascular permeability (Egen *et al.*, 1989; Cardenas & Clements, 1992; Adrian Hodgson *et al.*, 1994) through the hydrolysis of ester bonds in sphingomyelin in mammalian cell membranes following infection (Carne *et al.*, 1978; Lipsky *et al.*, 1982; Coyle & Lipski, 1990; Tachedjian *et al.*, 1995; Navas, 1996; Tambourgi *et al.*, 2002; Dorella *et al.*, 2006a), beyond enabling the bacteria to escape from neutrophils, and impairing neutrophil chemotaxis toward the site of infection (Yozwiak & Songer, 1993).

Several studies have been carried out involving the biological activities of *C. pseudotuberculosis* PLD, as well as its molecular structures, and results have shown similarities with sphingomyelinases present in the venom of the medically important spider genus *Loxosceles* (Bernheimer *et al.*, 1985; Songer, 1997; Tambourgi *et al.*, 2002; van Meeteren *et al.*, 2004; Binford *et al.*, 2005). Unlike diphtheria toxin, which occurs in about half of the isolates of *Corynebacterium diphtheria* (Saragea *et al.*, 1966; Toshach *et al.*, 1977), PLD probably is characteristic of most or almost all strains of *C. pseudotuberculosis* and *C. ulcerans* and have not been found in any other corynebacteria (Barksdale *et al.*, 1981).

Due to the immunogenic characteristic of the PLD, it has often been used as a tool in vaccine development against CLA. The vaccines that are currently produced for control of CLA generally use formalin-inactivated PLD-rich *C. pseudotuberculosis* culture supernatants because PLD is considered the major protective antigen (Johnson & Nicholls, 1994; Pizza *et al.*, 1995; Adrian Hodgson *et al.*, 1999), or they use DNA as vaccine (Rose, 2002). Although a commercial vaccine is already available, it is thought that conventional attenuated vaccines

are still more advantageous as they offer better long-lived humoral and cytotoxic T-lymphocyte responses (Chaplin *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 1996) with only a single dose in mice (Chaplin *et al.*, 1999). Hodgson and colleagues (1994) used a strain of *C. pseudotuberculosis* with the *pld* gene deleted from the chromosome and showed that a single subcutaneous vaccination of this attenuated strain, Toxminus, protected sheep against wild-type challenge (Hodgson *et al.*, 1992; Hodgson *et al.*, 1994).

Pacheco and colleagues (2007) used the *pld* gene to develop a multiplex PCR (mPCR) assay that also included the *rpoB* and 16S rRNA genes. This methodology allowed to differentiate *C. pseudotuberculosis* from other closely related species of Corynebacteria such as *C. ulcerans* and *C. diphtheriae*, (Dorella *et al.*, 2006a), thus supplying an accurate diagnostic method for CLA directly for clinical use.

AroB and aroQ: amino acid biosynthesis

Dehydroquinases are enzymes involved in the shikimate biosynthetic pathway. Amino acid biosynthesis was described mainly in *Escherichia coli* (Kleanthous, 1990) from which the dehydroquinases have already been purified (Chaudhuri *et al.*, 1986), cloned, sequenced, and overexpressed (Duncan *et al.*, 1986). These enzymes consist of three constitutively expressed subtypes: a monofunctional form (Berlyn & Giles, 1969; Chaudhuri *et al.*, 1987), a bifunctional form found in plants and a multifunctional form of dehydroquinase, which is a large polypeptide (Kleanthous, 1990).

Kim and colleagues (2006) reported the presence in *Mycobacterium tuberculosis* of such enzymes which are essential for the biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, tryptophan (Garbet, 1990) and other aromatic compounds in bacteria and other organisms such as fungi, algae and plants, but they are absent in mammals (Haslam, 1993; Kim *et al.*, 2006). An advantage of the non-occurrence of these enzymes in mammals is the possibility of the development of new drugs (Camus *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2006).

Several pathogens have been attenuated by mutations in the aromatic amino acid biosynthetic pathway such as some *Salmonella ssp.* (Hoiseth &

Stocker, 1981; Levine *et al.*, 1987; Schijns *et al.*, 1994) and other pathogenic bacteria. Thus, Simmons and colleagues (1997) obtained *C. pseudotuberculosis* strains that lack virulence through attenuation of *aroB* and *aroQ* gene, using allelic exchange. Such strains were unable to cause CLA in murine models, suggesting its use as vaccine vectors and a potential attenuated vaccine in the control of CLA (Simmons *et al.*, 1998).

FagA, fagB, fagC and fagD: iron uptake

Iron acquisition is one of the most important factors for bacterial survival during infection in the host environment (Brown & Holden, 2002). This mechanism has been widely described in gram-negative bacteria and also in gram-positive bacteria, where several papers have been published on the molecular basis of iron uptake (Heinrichs *et al.*, 1999; Brown & Holden, 2001).

Studies in *Staphylococcus aureus* have reported some genes and pathways involving iron uptake and the search for the presence of siderophores (Courcol *et al.*, 1997) and systems using ABC transporters of three compounds (Heinrichs *et al.*, 1999; Sebulsky *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 2001; Sebulsky & Heinrichs, 2001). A common characteristic of the occurrence of genes encoding iron transporters is their location in pathogenicity islands (PAIs), where there is evidence of horizontal transfer (Brown & Holden, 2002). PAIs have also been described in gram-positive organisms such *C. diphtheriae* and *S. pneumoniae*, where *C. diphtheriae* possesses a gene (*IRP1*) homologous to the ABC transporter gene (*pia*) involved in iron uptake in *S. pneumoniae*, located inside a PAI (Schmitt *et al.*, 1997).

Wennerhold and colleagues (2005) identified a protein DtxR, which is involved in the regulation of iron uptake, mainly in high GC gram-positive genera [e.g., *Corynebacterium*, *Mycobacterium* and *Rhodococcus* (Tao *et al.*, 1994; Rodriguez & Smith, 2003)], and modulates the expression of siderophores and other compounds in the iron acquisition pathway.

However, in *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Billington and colleagues (2002) described an operon (fagABC) with 32-47% identity to proteins involved in bacterial iron uptake systems such as ABC transporters which confer

to *C. pseudotuberculosis* persistence in a goat infection model. Present in this operon are four genes: *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD*, located downstream from the *pld* gene. An approach used to study such genes was the fusion of the operon to *lacZ* gene to evaluate expression. It was observed that the operon was poorly expressed in iron-rich media, and in iron-limited media, the expression of β -galactosidase activity was increased about threefold, suggesting that the expression of this operon appears to contribute to the virulence of bacteria.

Heat shock proteins: chaperonin immunogenicity and vaccine development

Heat shock proteins (HSPs) are one of the most highly conserved group of proteins among organisms (Qamra *et al*, 2005). They were initially described as being involved in thermal stress, but it is currently known that HSPs participate in other events such as nutrient depletion, hypotaxia, metabolic disruption, viral infection, transformation (Young & Elliot, 1989; Morimoto & Milarski, 1990; Young, 1990; Kultz, 2005) and other cellular processes. Chaperonin proteins are found in almost all organisms (if not all) (Braig, 1998) and are classified into six families: *Hsp10*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90* and *Hsp100*. However, in prokaryotes, the HSPs most characterized are *hsp60* (*groEL*), *hsp70* (*dnaK*) and *hsp10* (*groES*) (Eom *et al.*, 2005), and in the genus *Corynebacterium* genus two paralogue genes of *hsp60* have been described (Barreiro *et al.*, 2004).

Studies conducted by Coelho and colleagues (unpublished data) characterized and isolated for the first time the *hsp10* and *hps60* genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. It is known that the majority of HSPs are able to promote a humoral and cellular response, and therefore, they have immunogenic properties. Based on this information, the same research group tested an *hsp60* DNA vaccine and a recombinant protein subunit vaccine in challenges in mice and obtained a significant production of specific IgG.

RecA and rpoB of C. pseudotuberculosis: diagnostics and phylogeny

The protein RecA is present in eubacteria in general and is a highly conserved protein among bacterial organisms (Roca & Cox, 1990; Clark &

Sandler, 1994; Kowalczykowski *et al.*, 1994). It participates in homologous recombination, DNA repair, and the SOS response. Specifically, it binds stretches of single-stranded DNA and unwinds duplex DNA (Karlím *et al.*, 1995). In this context, Pogson (1996) generated isogenic mutants of *C. pseudotuberculosis* where the *recA* gene was mutated. As a result, a 10- to 12-fold reduction in recombination was obtained in the mutants compared with the parental strain, suggesting its use as a vaccine vector.

The *rpoB* gene is responsible for encoding the β -subunit of DNA-dependent RNA polymerase (Severinov *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 2002); however, there are several lines of evidence suggesting its relation with rifampin resistance (Kim *et al.*, 1999). Recently, *rpoB* sequences were used as an alternative tool for determining the phylogeny of some enteric bacteria (Mollet *et al.*, 1997), *Borrelia* (Lee *et al.*, 2000; Renesto *et al.*, 2000), *Mycobacterium* (Kim *et al.*, 1999), and *Bartonella* (Renesto *et al.*, 2001). Dorella *et al.* (2006) used the *rpoB* and 16S rRNA genes to build a phylogenetic tree of the genus *Corynebacterium* genus. This work showed that *C. pseudotuberculosis* is more closely related to *C. ulcerans* than to *C. diphtheriae*, suggesting that *C. diphtheriae* diverged from both at some time.

Novel protein of *C. pseudotuberculosis* – CP40: other secreted toxin?

A novel gene of *C. pseudotuberculosis* discovered by Wilson (1995) CP40 encodes a protein with a molecular weight of 40 kDa and length of about 351 amino acids. Preliminary characterization of the CP40 protein revealed that it is probably a serine protease, although it did not have any homology with motifs of other serine proteases in database searched. Perhaps this absence of homology has occurred because CP40 is intrinsic to *C. pseudotuberculosis*.

This protein showed biochemical similarities with the protein PLD. Both are hydrophobic (von Heijne, 1983; von Heijne, 1985) and have a leader sequence containing an Ala-x-Ala cleavage motif at the C terminus. This protein was found in *C. pseudotuberculosis* culture supernatant, indicating that it is probably secreted (Walker *et al.*, 1994).

**Approach of the gene content of *C. pseudotuberculosis*:
perspectives**

Currently, there are great advances in genomics, mainly in the optimization of sequencing techniques, which means that sequencing has become less expensive and more accurate. A massive deposit of sequences such as GSS (genomic sequence survey) in public databases has facilitated searches for homology and prediction of novel genes. Through these advances in the genomic field, we aim at to use such tool for the discovery of new genes, new diagnostics and more efficient vaccines for CLA control. Moreover, genomes of several *Corynebacteria* ssp. are widely available, where this information can be used in comparative genomics to help gain better insight into gene content and genomic organization of *C. pseudotuberculosis*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work received funding from FAPEMIG REDE-2829/05 and CNPq.

REFERENCES

- Barksdale L, Linder R, Sulea IT, Pollice M (1981) Phospholipase D Activity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (*Corynebacterium ovis*) and *Corynebacterium ulcerans*, a Distinctive Marker Within the Genus *Corynebacterium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 13:335-343.
- Barreiro C, Gonzalez-Lavado E, Patek M, Martín JF (2004) Transcriptional Analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: Characterization of Heat Shock-Induced Promoters. *Journal of Bacteriology*. 1: 4813–4817.
- Bayan N, Houssin C, Chami M, Leblon G (2003) Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J. Biotechnol.* 104:55–56.
- Bernheimer AW, Campbell BJ, Forrester LJ (1985) Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Science*. 228: 590–591.
- Billington SJ, Esmay PA, Songer JG, Jost BH (2002) Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:41–45.
- Binford GJ, Cordes MHJ, Wells MA (2005) Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon*. 45:547–560.
- Braig K (1998) Chaperonins. *Current Opinion in Structural Biology*. 8:159-165.
- Brown JS, Holden DW (2002) Iron acquisition by gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 4:1149–1156.

Brown JS, Gilliland SM, Holden DW (2001) A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* 40:572–585.

Brown JS, Ogunniyi AD, Woodrow MC, Holden DW, PatoJC (2001) Immunization with components of two iron-uptake ABC transporters protects mice against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 69:6702–6706.

Burrell DH (1983) Caseous lymphadenitis vaccine. *N. S. W. Vet. Proc.* 19:53–57.

Cabrera VL, Hernandez-Vera MA, Welsh O, Johnson WM, Castro-Garza J (2001) Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition. *J. Clin. Microbiol.* 39:3499–3504.

Cardenas L, Clements JD (1992) Oral immunization using live attenuated *Salmonella spp.* as carriers of foreign antigens. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:328-342.

Carne HR, Onon EO (1978) Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on endothelial cells of blood vessels. *Nature.* 271:246–248.

Cerdeño-Tarraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MTG, Pallen M, Bentley SD, (2003) The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.* 31:6516–6523.

Chaplin PJ, De rose R, Boyle JS, Mcwaters P, Kelly J, Tennent JM, Lew AM, Scheerlinck JPY (1999) Targeting improves the efficacy of a DNA vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect. Immun.* 67:6434–6438.

Chaudhuri S, Duncan K, Coggins JR (1987) 3-Dehydroquinone dehydratase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 142:320-324.

Chaudhuri S, Lambert JM, Mccoll LA, Coggins JR (1986) Purification and characterization of 3-dehydroquinase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 239:699-704.

Cole STR, Brosch J, Parkhill T, Garnier C, Churcher D, Harris SV, Gordon K, Eiglmeier S, Gas CE, Barry III F, Tekata K, Badcock D, Basham D, Brown T, Chillingworth R, Connor R, Davies K, Devlin, T, Feltwell S, Gentles N, Hamlin S, Holroyd T, Holroyd K, Jagels BG, et al (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393:537–544.

Collins MD, Falsen E, Akervall E, Sjoden B, Alvarez A, (1998) *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1449–1454.

Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE, (1982) Fatty acid composition of some mycolic acid containing coryneform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128:2503–2509.

Connor KM, Quirie MM, Baird G, Donachie W (2000) Characterization of United Kingdom isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38:2633–2637.

Courcol RJ, Trivier D, Bissinger MC, Martin GR, Brown MR (1997) Siderophore production by *Staphylococcus aureus* and identification of iron-regulated proteins. *Infect. Immun.* 65:1944–1948.

Coyle MB, Lipsky BA (1990) Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:227–246.

Davis HL, Mancini M, Michel ML, Whalen, RG (1996) DNA mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine.* 14:910–915.

Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V (2006) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res.* 37(2):201-18.a

Dorella FA, Fachin MS, Billault A, Dias Neto E, Soravito C, Oliveira SC, Meyer R, Miyoshi A, Azevedo V (2006) Construction and partial characterization of a *Corynebacterium pseudotuberculosis* bacterial artificial chromosome library through genomic survey sequencing. *Genet Mol Res.* 5:653-63.b

Dorella FA, Estevam EM, Pacheco LGC, Guimarães CT, Lana UG, Gomes EA, Barsante MM, Oliveira SC, Meyer R, Miyoshi A, Azevedo V (2006) In vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl Environ Microbiol.* 72:7368-72c.

Egen B, Mcnamara PJ, Sammons DW, Humphreys R, Songer JG (1989) Purification of the phospholipase D of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by recycling isoelectric focusing. *Am. J. Vet. Res.* 50:1319–1322.

Funke G, Lawson PA, Collins MD (1995) Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium auris* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:735–739.

Garg DN, Nain SPS, Chandiramani, NK (1985) Isolation and characterization of *Corynebacterium ovis* from sheep and goats. *Indian Vet. J.* 62:805–808.

Goodfellow M & Williams ST (1989) Suprageneric classification of actinomycetes, in: (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 2333–2343.

Halbert ND, Reitzel RA, martens RJ, Cohen ND (2005) Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the *vapA* gene. *Am J Vet Res.* 66:1380–1385.

Hall V, Collins MD, Hutson RA, Lawson PA, Falsen E, Duerden BI (2003) *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1065–1068.

Hard GC (1975) Comparative toxic effect on the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 12:4139–1449.

Hard GC (1969) Electron microscopy examination of *Corynebacterium ovis*. *J. Bacteriol.* 97:1480–1485.

Heinrichs JH, Gatlin LE, Kunsch C, Choi GH, Hanson MS (1999) Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 181, 1436-1443.

Hogson AL, carter K, Tachedjian M, Krywult, J Corner LA, Mccoll, M, Cameron A (1999) Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine.* 17:802–808.

Hodson ALM, Bird P, Nisbet IT (1990) Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Bacteriol.* 172:1256–1261.

Hodson ALM, Krywult J, Corner LA, Rothel JS, Radford AJ (1992) Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immun.* 60:2900–2905.

Hodson ALM, Tachedjian M, Corner LA, Radford AJ (1994) Protection of Sheep against Caseous Lymphadenitis by Use of a Single Oral Dose of Live Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity.* 62:5275-5280.

Hoiseth SK, Stocker BA (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*. 291:238–239.

Johnson VG, Nicholls PJ (1994) Identification of a single amino acid substitution in the diphtheria toxin A chain of CRM 228 responsible for the loss of enzymatic activity. *J Bacteriol*. 176:4766-4769.

Kallinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N et al. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol*. 104:5–25.

Karlim S, Weinstock GM, Brendel V (1995) Bacterial Classifications Derived from RecA Protein Sequence Comparisons. *Journal of Bacteriology*. 177:6881–6893.

Khamis A, Raoult D, La Scola B (2004) *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol*. 42:3925–3931.

Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH (1999) Identification of Mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol*. 37:1714–1720.

Kultz D (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol*. 2005.

Lipsky BA, Goldberger AC, Tompkins LS, Plorde JJ (1982) Infections caused by nondiphtheria corynebacteria. *Rev. Infect. Dis*. 4:1220–1235.

Mollet C, Drancourt M, Raoult TD (1997) *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol*. 26:1005–1011.

Morimoto RI & Milarski KL (1990) Expression and function of vertebrate Hsp70 genes. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, editors. Stress proteins in

biology and medicine. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1990. p. 323–59.

Navas J (1996) Genetic tools in pathogenic nocardioform actinomycetes. *Microbiologia*; 12:297–304.

Nishio Y, Nakamura Y, Kawarabayasi Y, Usuda Y, Kimura E, Sugimoto S, Matsui K, Yamagishi A, Kikushi H, Ikeo K, Gojobori T (2003) Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res.* 13:1572–1579.

O'Halloran DM & Cafferkey MT (2005) Multiplex PCR for identification of seven *Streptococcus pneumoniae* serotypes targeted by a 7-valent conjugate vaccine. *J Clin Microbiol.* 43:3487–3490.

Pacheco LGC, Pena R, Castro TPL, Dorella FA, Bahia RC, Carminati R, Frota MNL, Oliveira SC, Meyer R, Alves FSF, Miyoshi A, Azevedo V(2007) Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology.* 56:1-7.

Paton MW, walker SB, Rose IR, watt GF (2003) Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Aust. Vet. J.*81:91–95.

Paule BJA, Meyer R, Moura Costa, LF, Bahia CR, Carminati R, Regis LF, Vale VLC, Freire SM, Nascimento L, Schaer R, Azevedo V(2004) Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* 34:311–166.

Persson T, Hansen TH, Rasmussen TB, Skinderso ME, Givkov M, Nielsen J (2005) Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived

from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org Biomol Chem.* 3:253–262.

Pogson CA, Simmons CP, Strugnell RA, Hodson ALM (1996) Cloning and manipulation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis recA* gene for live vaccine vector development. *FEMS Microbiol. Lett.* 142:139–145.

Qamra R, Mande SC, Coates ARM, Henderson B (2005) The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 85:385–394.

Renesto P, Lorvellec, KG, Drancourt (2000) *rpoB* gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. *J. Clin. Microbiol.* 38:2200–2203.

Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D (2001) Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 39:430–437.

Saragea A, Maximescu P, Meitert E, Stuparu I, Vieru E, Petrus V, balteanu C (1966) Incidenta si distributia geografica a tipurilor fagice de *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiol. Parazitol. Epidemiol.* 11:351-362. Schijns VE, Haagmans BL, Rijke EO, Huang S, Aguet M, Horzinek MC (1994) IFN-gamma receptor-deficient mice generate antiviral Th1- characteristic cytokine profiles but altered antibody responses. *J. Immunol.* 153:2029–2037.

Sebulsky MT, Heinrichs DE (2001) Identification and characterization of *fhuD1* and *fhuD2*, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183:4994–5000.

Severinov K, Mustaev A, Kukarin A Muzzin O, Bass I, Darst SA, Goldfarg A (1996) Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 271:27969–27974.

Simmons CP, Hodgson ALM, Strugnell RA (1997) Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 65:3048–3056.

Simmons CP, Dunstan SJ, Tachedjian M, Krywult J, Hodgson AL, Strugnell RA(1998) Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 66:474–479.

Songer JG, Beckenbach K, Marshall MM, Olson GB, Kelley L (1988) Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 49:223–226.

Songer JG (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5:156–160.

Tachedjian M, Krywult J, Moore RJ, Hodgson AL Caseous lymphadenitis vaccine development: site-specific inactivation of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D gene. *Vaccine.* 13:1785–1792.

Tambourgi DV, Da Silva MS, Billington SJ, Gonçalves RMA, Magnoli FC, Songer JG, Van Den Berg, CW (2002) Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunol.* 107:93–101.

Tao X, Schiering N, Zeng HY, Ringe D, Murphy JR (1994) Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol. Microbiol.* 14:191–197.

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, Viehoveer P, Puhler A (2005) Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* 187: 4671-4682.

Toshach S, valentine A, Sigurdson S (1977) Bacteriophage typing of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Infect. Dis.* 136:655-660.

vanMeeteren LA, Rederiks F, Giepmans BNG, Pedrosa MFF, Billington SJ, Jost BH, Tambourgi DV, Moolenaar WH (2004) Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 279:10833–10836.

Von Heijne G (1983) Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 133:17–21.

Von Heijne G (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* 184:99–105.

Wadowsky RM, Michaels RH, Libert T, Kingsley LA, Herlich GD (1996) Multiplex PCR-based assay for detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab specimens. *J Clin Microbiol.* 34:2645–2649.

Walker J, Jackson HJ, Eggleton DG, Meeusen ENT, Wilson MJ, Brandon MR (1994) Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect. Immun.* 62:2562–2567.

Wennerhold J, Krug A, Bott M (2005) The AraC-type Regulator RipA Represses Aconitase and Other Iron Proteins from *Corynebacterium* under Iron Limitation and Is Itself Repressed by DtxR. *The Journal of Biological Chemistr.* 280:40500–40508.

Williamson LH (2001) Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17:359–371.

Wilson MJ, Brandon MR, Walker J (1995) Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kDa antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 63:206–211.

Yozwiak ML & Songer JG (1993) Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D on viability and chemotactic responses of ovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 54:392-397.

VII.4. Currículo

VÍVIAN D'AFONSECA DA SILVA

CURRÍCULO VITAE

Março
2008

1 – DADOS PESSOAIS

Nome: Vivian D'Afonseca da Silva.

Nacionalidade: Brasileira.

Local e data de nascimento: Brasília/DF – Brasil 06/05/1983.

Filiação: Haroldo da Silva e Eloisa d'Afonseca da Silva.

Carteira de identidade: 2038285- SSP/DF - 18/02/1998.

CPF: 95311238100.

Título de eleitor:

Estado civil: Solteiro.

Endereço residencial: Rua Belterra, Nº. 224, Apto. 202. Ed. Valência Bairro
Ouro Preto.

(Preferencial)

Belo Horizonte – MG. CEP: 31310-480.

Fone: (31) 3347-7141.

Endereço profissional: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de

Ciências Biológicas – UFMG – ICB.

Av. Antônio Carlos, 6627 Pampulha - Belo Horizonte

31270-901 Telefone: 31 34092778.

2 – FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 – Graduação (2001 – 2005)

Bacharelado em Ciências Biológicas.

Curso de Ciências Biológicas.

Centro Universitário de Brasília – UniCEUB Brasília/DF

2.2 – Mestrado (2007 – atual)

Mestrado em Genética.

Programa de Pós-Graduação em Genética.

Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais.

Título da dissertação: “Construção de uma biblioteca genômica de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e sua caracterização através de Genome Survey Sequence (GSS)”.

2.3 – Aperfeiçoamento em Bioinformática (2007)

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

Título: Bioinformática

3 – IDIOMAS

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

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

4 – ÁREA DE ATUAÇÃO

4.1 – Genética

Genética molecular:

- Genética de microrganismos procariotos.
- Genômica.
- Genômica comparativa.

5 – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 – Resumos publicados em anais de eventos científicos:

5.1.1. SOARES, S. C., D'AFONSECA, V., DORELLA, F., CAPANEMA, E.R., AZEVEDO, V., MIYOSHI, A.

Análise de Plasticidade Genômica de linhagens de *Corynebacterium diphtheriae* através de PCR (Plasticity of Chromosome Released by Long Range - Polymerase Chain Reaction) In: 24^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

5.1.2. D'AFONSECA, V., MORAES, P., PACHECO, L.G.C., DORELLA, F., CAPANEMA, E.R., PENA, I., PROSDOCIMI, F., ORTEGA, J. M., MEYER, R., OLIVEIRA, G. C., OLIVEIRA, S. C., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Partail-genome sequence through GSS analyses and comparative genomic of *Corynebacterium pseudotuberculosis* the ethiological agent of Caseous Lymphadenitis Disease In: 24^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília.

5.1.3. D'AFONSECA, V., LISBOA, E. D., REIS, M., RESENDE, V. P., SA, M., TINOCO, M. L., ROMANO, E.

Silencing of SERK gene using the technique of RNA interference in tobacco In: 34^a Reunião Anual de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia - SP.

5.1.4. LISBOA, E. D., SA, M., D'AFONSECA, V., RESENDE, V. P., TINOCO, M. L., REIS, M.

Expression of antiquitin gene confers a salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* In: 50^o Congresso Brasileiro de Genética, 2004, Florianópolis - SC.

5.2 – Artigos submetidos a periódicos científicos ou aceitos:

5.2.1. D'AFONSECA, V., MORAES, P., DORELLA, F., PACHECO, L.G.C., MEYER, R., PORTELA, R. W., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

A description of genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* useful in diagnostics and vaccine applications. *Genetics and Molecular Research*, 2008.

5.2.2. CAPANEMA, E.R., ALMEIDA, B. P. X. C., RUIZ, J. C., OLIVEIRA, G. C., LOBO, F. P., D'AFONSECA, V., MEYER, R., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Brazilian genome sequencing projects: state of art. *Bentham Science*, 2008.

5.2.3. D'AFONSECA, V., PROSDOCIMI, F., DORELLA, F.A., PACHECO, L.G.C., MORAES, P., ORTEGA, J.M., PENA, I., TEIXEIRA, S., OLIVEIRA, S.C., OLIVEIRA, G., OLIVEIRA, L.M., COSER, E.M., MEYER, R. MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.

Genome organization and gene content characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Genomics*, 2008.

6 – EXPERIÊNCIA DIDÁTICA

6.1 – Disciplinas de graduação (aulas ministradas):

6.1.1-Módulo de genética molecular da disciplina “Genética e Evolução para o curso de Enfermagem” oferecida pelo Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Período: Agosto - Setembro de 2007.

Carga horária: 20 horas.

Supervisão: Prof. Dr. Vasco Azevedo.

7 – FORMAÇÃO DE PESSOAL (ORIENTAÇÃO)

7.1. Anna Thereza Dias Bomfim

- Função: Iniciação Científica
- Instituição: UNA - BH
- Programa: Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas
- Local do estágio: Laboratório de Genética Celular e Molecular do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Período: Fevereiro de 2006 a Outubro de 2006 (**concluído**).
- Responsáveis: Dr. Vasco Azevedo (orientador) & Dr. Anderson Miyoshi (co-orientador).

7.2. Pablo Matias de Oliveira Moraes

- Função: Iniciação Científica
- Instituição: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Programa: Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas – Genética do Departamento de Biologia Geral – ICB/UFMG.
- Local do estágio: Laboratório de Genética Celular e Molecular do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Período: Fevereiro de 2007 a atual.
- Responsáveis: Dr. Vasco Azevedo (orientador) & Dr. Anderson Miyoshi (co-orientador).

8 – PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

8.1. 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Apresentação de Poster / Painel: Análise de Plasticidade Genômica de linhagens de *Corynebacterium diphtheriae* através de PCR (Plasticity of Chromosome Released by Long Range - Polymerase Chain Reaction). 2007.

8.2. 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Apresentação de Poster / Painel: Partial-genome sequence through GSS analyses and comparative genomic of *Corynebacterium pseudotuberculosis* the ethiological agent of Caseous Lymphadenitis Disease. 2007.

8.3. V Congresso Brasileiro de Biossegurança e V Simpósio Latino Americano de Produtos Transgênicos. 2007.

8.4. I Simpósio Edmar Chartone de Microbiologia. 2006.

8.5. 50º Congresso Brasileiro de Genética. Apresentação de Poster / Painel: Expression of antiquitin confers a salt resistance in Arabidopsis thaliana. 2004.

8.6. Estágio voluntário - Laboratório de Citogenética Clínica – Pasteur, Brasília. 2004.

8.7. II Congresso UniCEUB de Ciências da Saúde. 2003.

8.8. DNA goes to school. 2002.

8.9. XII Fórum UniCEUB de Biociências. 2001.

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](#)